

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**EAP. DE MEDICINA VETERINARIA**

**Comparación de dos esquemas de inmunización contra  
*Mycoplasma hyopneumoniae* en porcinos de crianza  
intensiva provenientes de madres vacunadas**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

**AUTOR**

Karen Vanesa MANCO GUTIÉRREZ DE AURIS

**ASESOR**

Sonia Yenny CALLE ESPINOZA

Lima - Perú

2005

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	iv
SUMMARY	v
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE GRÁFICOS	vii
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE APÉNDICES	ix
I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1.- Antecedentes	3
2.2.- Etiología	4
2.3.- Epidemiología	5
2.3.1.- Agente	5
2.3.2.- Fuentes de Transmisión	6
2.3.3.- Hospedero	8
2.3.4.- Factores Ambientales	8
2.3.5.- Enfermedad	9
2.3.6.- Complejo Respiratorio Porcino	11
2.4.- Inmunidad	12
2.4.1.- Inmunidad Humoral	12
2.4.2.- Inmunidad Celular	13
2.5.- Patogenia	15
2.6.- Signos Clínicos	17
2.7.- Lesiones	18
2.8.- Diagnóstico	19
2.8.1.- Pruebas de Laboratorio que detectan Antígenos	20
2.8.1.1.- Anticuerpos Fluorescentes	20
2.8.1.2.- Inmunohistoquímica	20
2.8.1.3.- Reacción en cadena de la Polimerasa	21
2.8.2.- Pruebas Serológicas	22
2.8.2.1.- Fijación de Complemento	22
2.8.2.2.- Inmuno Ensayo ligado a Enzimas	23
2.8.2.2.1.- ELISA indirecto	23
2.8.2.2.2.- ELISA de Bloqueo	24
2.8.3.- Evaluación de Rastro	25
2.9.- Control y Prevención	26

2.9.1.- Control por Erradicación	26
2.9.2.- Control por medidas de Manejo y Bioseguridad	27
2.9.3.- Vacunación	28
2.9.3.1.- Vacunación de Marranas	28
2.9.3.2.- Vacunación de lechones	29
 III.- MATERIALES Y MÉTODOS	 31
3.1.- Lugar de Estudio	31
3.2.- Sistema de manejo de los porcinos en la granja	31
3.3.- Animales y Tamaño Muestral	32
3.4.- Materiales usados en el Muestreo	33
3.5.- Materiales y Equipos usados en el Laboratorio	33
3.6.- Método de Colección de la Muestra	33
3.7.- Método de Detección de Anticuerpos	34
3.7.1.- Preparación de las muestras	34
3.7.2.- Preparación de la solución de lavado	34
3.7.3.- Procedimiento del análisis	34
3.7.4.- Lectura e Interpretación de resultados serológicos	35
3.8.- Método de Evaluación de Consolidación Pulmonar	36
3.9.- Análisis Estadístico	38
 IV.- RESULTADOS	 39
 V.- DISCUSIÓN	 46
 VI.- CONCLUSIÓN	 52
 VII.- BIBLIOGRAFÍA CITADA	 53
 VIII.- APÉNDICE	 64

## RESUMEN

Se realizó un estudio para comparar dos esquemas de inmunización contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos de crianza intensiva provenientes de madres vacunadas, mediante la detección de anticuerpos por inmuno ensayo absorbente ligado a enzimas (ELISA), ganancia de peso y grado de consolidación pulmonar. Un total de 90 animales fueron utilizados y distribuidos en tres grupos, el primer grupo fue vacunado los días 35 y 56, el segundo grupo fue vacunado los días 42 y 56, en el grupo control se usó un placebo (Suero fisiológico); la inmunización fue 2 ml de una bacterina oleosa. Los animales fueron pesados a los 21 y 145 días, para obtener la ganancia de peso y se evaluó el grado de consolidación pulmonar en camal. Mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA) por arreglo factorial, se obtuvo diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) respecto a la ganancia de peso siendo el grupo vacunado los días 42 y 56 el que ganó mayor peso; aunque el grupo vacunado los días 35 y 56 obtuvo mayores niveles de títulos de anticuerpos. Mediante la prueba de Kruskal Wallis no se encontró diferencia estadística significativa entre los grupos con relación a la consolidación pulmonar.

**PALABRAS CLAVES:** Neumonía por micoplasma, Neumonía Enzoótica, *Mycoplasma hyopneumoniae*, vacunación, ganancia de peso, consolidación pulmonar.

## SUMMARY

A study was made to compare two schemes of immunization against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs of intensive raising of vaccinated mothers, by detection of antibodies by immuno absorbent test related to enzymes (ELISA), gain of weight and degree of pulmonary consolidation. 90 animals were used distributed in three groups, the first was vaccinated days 35 and 56, the second was vaccinated days 42 and 56, in the control placebo was used (physiological serum); the immunization was 2 milliliters of an oleosa bacterina. The animals were heavy to the 21 and 145 days, to obtain the gain of weight and the degree of pulmonary consolidation in slaughterhouse was evaluated. The test of analysis of varianza (ANOVA) by factorial adjustment was used to obtain significant statistical difference ( $p < 0,05$ ) with respect to the gain of weight, the vaccinated group 42 and 56 days was that gained greater weight; although the vaccinated group days 35 and 56 obtained greater levels of titles of antibodies. By the test of Kruskall Wallis was not significant statistical difference between the groups in relation to the pulmonary consolidation.

KEY WORDS: Mycoplasmal pneumonia of swine, *Mycoplasma hyopneumoniae*, vaccination, gain of weight, pulmonary consolidation.

## LISTA DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1.- Ganancia de peso promedio e intervalo de confianza de los grupos en el experimento.	41
Cuadro 2.- Ganancia de peso promedio e intervalos de confianza por sexos en los animales estudiados en el experimento.	41
Cuadro 3.- Ganancia de peso promedio e intervalos de confianza resultado de la interacción por grupo y sexo de los animales dentro del experimento.	42
Cuadro 4.- Media e Intervalo de confianza de Títulos de anticuerpos con relación a los días de toma de muestras de los tres grupos en el experimento.	42
Cuadro 5.- Número y porcentaje de porcinos seropositivos y seronegativos a <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> de acuerdo a los grupos del experimento.	45
Cuadro 6.- Grado de lesión pulmonar según grupo de los animales al final del experimento.	45

## LISTA DE GRÁFICOS

	Pag.
Gráfico 1.- Títulos de Anticuerpos contra <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> , con diferentes programas de inmunización en porcinos provenientes de madres vacunadas.	43
Gráfico 2.- Porcentaje de animales seropositivos a la prueba de ELISA según el día de muestreo y grupo respectivo.	44

## LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1.- Porcentaje de participación de cada lóbulo en relación del peso total del pulmón de un porcino.	36
Tabla 2.- Puntuación según la extensión de la lesión de consolidación pulmonar en cada lóbulo de un porcino.	37
Tabla 3.- Puntuación por Área de consolidación pulmonar por lóbulos de un porcino.	37
Tabla 4. - Puntuación relativa a las categorías de volumen de consolidación pulmonar de un porcino.	38



## LISTA DE APÉNDICES

	Pag.
Apéndice 1. – Ganancia de peso promedio, valores máximos y mínimos y desviación estándar de los grupos dentro del experimento.	64
Apéndice 2. – Peso promedio final e intervalos de confianza por grupos en el experimento.	65
Apéndice 3.- Peso promedio final e intervalo de confianza con relación al sexo en el experimento.	65
Apéndice 4.- Peso promedio final e intervalos de confianza por grupo y sexo en el experimento.	66
Apéndice 5.- Ganancia de peso promedio final, valores máximos y mínimos, desviación estándar de los pesos en el experimento.	66

Apéndice 6. – Títulos de Anticuerpos promedios, valores máximos y mínimos y desviación estándar de los grupos muestreados en diferentes fechas de muestreo.	67
Apéndice 7.- Grado de lesión pulmonar según grupo y sexo de los animales al final del experimento.	68
Apéndice 8.- Análisis Estadístico para grado de consolidación pulmonar según la prueba de Kruskall Wallis.	68
Apéndice 9.- Análisis Estadístico según la correlación de Sperman para relacionar ganancia de peso y grado de consolidación pulmonar.	69
Apéndice 10.- Valor de títulos de anticuerpos por fecha de muestreo y resultados a la prueba de ELISA.	69

## I.- INTRODUCCIÓN

Muchos productores porcinos han cambiado sus sistemas productivos actualizándolos con las nuevas tecnologías, sin embargo estos sistemas no han podido eliminar totalmente los problemas respiratorios de sus piaras (Dudley, 1997). Son muchos agentes que causan problemas respiratorios en porcinos, siendo los principales el *Mycoplasma hyopneumoniae* (Desrosiers, 2001), el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo de los Porcinos (PRRS) y el virus de la Influenza porcina (Dudley, 1997).

*Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh) es causante de la enfermedad respiratoria de mayor impacto económico en la producción porcina, porque origina retraso en el crecimiento, aumento en la conversión alimenticia, desuniformidad del lote y mayor número de días en alcanzar el peso a camal (Camacho, 2003).

Se ha estimado que las pérdidas económicas causado por *Mycoplasma hyopneumoniae* sobrepasan el billón de dólares anuales (Keich *et al.*, 2001). Las pérdidas económicas asociadas a la enfermedad son el resultado de una compleja interacción entre el micoplasma y otras infecciones, un mal manejo y malas condiciones del medio ambiente (Ross, 2000).

Las enfermedades respiratorias tienen su efecto detrimetral mas serio en la etapa final del crecimiento. En esta etapa es cuando la morbilidad y la mortalidad alcanzan sus niveles más altos ocasionando un considerable

impacto económico (Moguel-Molina *et al.*, 1998).

A pesar que la introducción de vacunas comerciales en el mercado se ha dado hace varios años atrás, esta enfermedad sigue siendo un problema (Chang, 2001), ya que no se logra eliminar totalmente.

En granjas porcinas del Perú aún existe la crianza de tipo artesanal, razón por la cual el aspecto sanitario no es el más adecuado y representa un serio problema no sólo para la granja sino también para otras granjas y más aún para la población humana en general.

El objetivo del presente trabajo, fue determinar mediante serología el comportamiento de los títulos de anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae* y su repercusión en la ganancia de peso y lesiones pulmonares en un sistema continuo típico del Perú, para esto se utilizaron dos programas diferentes de inmunización. Los resultados de este ensayo, además de evaluar el estado de la granja frente al *Mycoplasma hyopneumoniae* busca servir de modelo para la evaluación de otras granjas, no pudiéndose utilizar el mismo esquema debido a que cada granja es un mundo diferente.

## II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1.- Antecedentes

La neumonía por *Mycoplasma* ha sido reportada en varios países y es una de las enfermedades más comunes y económicamente importante en la producción porcina (Ross, 1986). Durante mas de cien años se ha conocido la enfermedad (Goodwin, 1982), sin embargo inicialmente se le consideraba como pasteurellosis crónica de los porcinos hasta que “Hutyra” en 1997 excluyó el papel primario de la infección denominándola “Neumonía enzoótica del cerdo” (Stipkovits, 1995).

En los años de 1930, se iniciaron los estudios de agentes virales, atribuyéndose esta enfermedad a un virus de Influenza (Piffer, 1983), se pensó que podía ser un virus debido a que no era removido por filtros como si lo eran las bacterias (Janke, 1997). La caracterización de la neumonía crónica en porcinos fue propuesto en trabajos de investigación de Pullar (1948), Gulrajani y Beveridge (1951).

En 1965 tanto Mare y Switzer, así como; Goodwin *et al.*, describieron por primera vez el aislamiento del *Mycoplasma* a partir de un pulmón neumónico y la reproducción experimental de la enfermedad; denominándolos *M. hyopneumoniae* y *M. suis* respectivamente, dándose prioridad al primer nombre.

Actualmente se considera *Mycoplasma hyopneumoniae* como denominación correcta y está avalado desde 1974 por el subcomité de

taxonomía de *Mycoplasma* (Trully y Whitcomb, 1979).

## 2.2.- Etiología

Los Micoplasmas son los organismos más pequeños capaces de replicarse en medios de cultivo exentos de células. Se distinguen fenotípicamente de las otras bacterias por su tamaño reducido y la ausencia total de pared bacteriana. Taxonómicamente pertenecen a la Clase Mollicutes, Orden Mycoplasmatales y Familia Mycoplasmataceae (Poveda *et al.*, 2000)

Son organismos extracelulares que se reproducen por fisión binaria como otras bacterias, pero como carece de pared no son susceptibles a ningún componente antimicrobial que interfiera con la producción en la pared celular (Janke, 1997).

*M. hyopneumoniae* resiste 30 minutos a 45 °C, pero a 50 °C se destruye en 5 minutos. Soporta liofilización y temperaturas de -180 °C. Desaparece del pelo y ropa en 48 horas en ambiente seco, pero puede sobrevivir por largos períodos de tiempo en líquido idóneo ya que en desecación no sobrevive mas de una semana (Andrada, 2001).

El aislamiento del microorganismo es complicado debido a sus características nutricionales (Andrada *et al.*, 2002), requisitos de crecimiento sumamente exigentes y la presencia del *M. hyorhinis* (metaboliza la glucosa y acidifica el medio) como agente secundario en las neumonías del cerdo (Ross, 2000).

En caldos de cultivo primarios *M. hyopneumoniae* crece lentamente, produciendo una tenue turbidez y un cambio de color ácido entre 3 y 30 días de incubación (Andrada *et al.*, 2002), generalmente los cultivos son pasados varias veces en caldo y se inoculan en una atmósfera de 5 a 10 % de dióxido de carbono; las colonias son apenas visibles después de 2-3 días de inoculación, pero gradualmente incrementan su medida de 0.25 a 1 mm en

aproximadamente 10 días (Ross, 1986).

En medios sólidos los micoplasmas no tienen la característica propia de “huevo frito” a diferencia del desarrollo en medios especiales, donde los micoplasmas tienen tamaño variable (200-300 nm) mostrando una zona central opaca y una zona periférica translúcida (Rubin y Farber, 1990).

*M. flocculare* es un no patógeno común en pulmones de cerdo, es muy similar al *M. hyopneumoniae* en cuanto a morfología, desarrollo y antigenicidad (Ross, 2000). *M. hyopneumoniae* y *M. flocculare* requiere esteroides para su crecimiento y no presentan reacciones claras en la fermentación de la glucosa y manosa, son negativos a la hidrólisis de la arginina, urea y la actividad fosfatasa, y muestran variabilidad en la formación de películas, cristales y reducción del tetrazolium (Andrada *et al.*, 2002).

Los Micoplasmas tienen la capacidad de cambiar los antígenos de superficie (Ross, 2000). Con el pasar de los años y la biotecnología se ha podido codificar algunas proteínas inmunogénicas, incluyendo proteínas citosólicas como p36, de membrana p46, p65 y p74 y la adhesina p97 (Chang, 2001).

Artiushin y Minion en 1996 evidenciaron que existe heterogenicidad entre aislamientos de *M. hyopneumoniae*. Innumerables estudios indican la variación antigénica y genética de cepas de Micoplasma (Desrosiers, 2001).

## **2.3.- Epidemiología**

### **2.3.1.- Agente**

Los Micoplasmas son microorganismos pleomórficos, que varían desde formas esféricas, ligeramente cocoides o piriformes hasta filamentos helicoidales de 0.3 a 0.8  $\mu\text{m}$  de diámetro, pudiendo atravesar filtros entre 200 y 450 nm (Andrada *et al.*, 2002).

Presentan una estructura sencilla constituida por una membrana trilaminar (lípidos y una fracción de proteínas), citoplasma que contiene ribosomas, gránulos citoplasmáticos y un núcleo procariótico característico, constituido por moléculas bicatenarias circulares de ADN y moléculas de ARN (Andrada *et al.*, 2002).

Recientemente avances biomoleculares han podido encontrar otras proteínas inmunogénicas, tales como proteínas de membrana p65 y p47 y la adhesina p102. También se han estudiado las proteína p7413, p 7048, p6523, p467 y p4026 (Andrada *et al.*, 2002).

*M. hyopneumoniae* con el pasar de los años ha disminuido su virulencia, pero esto es una dificultad por que implica que la naturaleza inherente al microorganismo incluye la habilidad de cambios en el fenotipo y en la expresión de las proteínas de membrana dependiendo del medio en el que se desarrolla (Thacker y Thacker, 1999c).

### 2.3.2.- Fuentes de Transmisión

Existen evidencias que *M. hyopneumoniae* es transmitido por aerosoles o por contacto directo con secreciones del tracto respiratorio de cerdos infectados (Janke, 1997). Goodwin en 1972 demostró que el organismo podía ser aislado de hisopados traqueales de cerdos enfermos.

Farrington (1976) y Etheridge *et al.* (1979) demostraron que la transmisión del microorganismo ocurre entre cerdos jóvenes del mismo corral, sin embargo, no siempre la enfermedad tiene lugar entre animales del mismo corral (Goodwin, 1972b).

Los cerdos que escapan a la infección en estadios tempranos de su vida pueden infectarse después cuando entran en contacto con otros cerdos como por ejemplo en el destete o en fases de crecimiento y acabado (Janke, 1997).



Debido a la naturaleza del microorganismo y el gran tamaño del inóculo requerido para la transmisión experimental de la enfermedad, es que no se puede transmitir fácilmente, a menos que existan cerdos portadores (Ross, 2000). En Gran Bretaña, Goodwin, 1985 encontró que los brotes ocurrían con mayor frecuencia cuando las piaras estaban separadas por menos de 3.2 Km (Ross, 2000).

En observaciones de campo se implicó a los cerdos portadores como la principal fuente de infección con *M. hyopneumoniae*. En un reporte de Pullar en 1948 encontró que en 190 piaras de cerdos australianos el 80% de los brotes estaba asociado a la introducción y comercialización de ganado y que solo el 20% fue asociado con introducción de lechones en las granjas.

En sistemas de producción continua, puede transmitirse *M. hyopneumoniae* y otros agentes patógenos respiratorios importantes en grandes cantidades de los cerdos adultos a los más jóvenes (Ross, 2000). El riesgo más alto de infección se encuentra en sistemas continuos, debido a la incorporación continua de cerdos nuevos a la granja (Andrada, 2001).

En sistemas “todo dentro todo fuera” la transmisión se da principalmente en la etapa de lactación, mientras que en sistemas de destete temprano segregado se evita la transmisión cuando los lechones se destetan a los 9 días de edad (Clark, 1997).

La infección de las crías es principalmente a través de las madres (Camacho, 2004). La transmisión vertical (intrauterina) o lactogénica aún no ha sido demostrada (Andrada *et al.*, 2002).

Nuevos estudios han examinado la posibilidad de transmisión por semen; en Finlandia se encontraron 101 muestras de semen positivas a *M. hyopneumoniae* (Desrosiers, 2001).

### 2.3.3.- Hospedero

*M. hyopneumoniae* es un microorganismo estrictamente del cerdo (Andrada *et al.*, 2002). Se desconoce si existen otros hospederos de este microorganismo, así como la participación de otros animales en su transmisión (Armstrong, 1982).

Los cerdos de diferentes edades parecen ser igualmente susceptibles al microorganismo (Ross, 2000); aunque bajo condiciones de campo los animales jóvenes son más susceptibles a padecer de neumonía micoplasmal del cerdo (NMC), la cual se manifiesta escasamente en animales adultos (Andrada *et al.*, 2002).

Piffer y Ross en 1984, estudiaron el efecto de la edad sobre la susceptibilidad a *M. hyopneumoniae* en animales de 3, 6 y 12 semanas, los cuales estuvieron en contacto por 27 días con animales infectados y no se encontró diferencia significativa en la intensidad de lesiones pulmonares (Andrada *et al.*, 2002).

Las cerdas jóvenes con bajo nivel de inmunidad son las que infectan a sus crías con micoplasma; las cerdas adultas generalmente son inmunes y protegen a sus camadas por un período de seis semanas, pero cuando baja la inmunidad el micoplasma infecta a los lechones susceptibles (Morilla, 1997).

Los lechones se infectan a partir de las 4 semanas de edad y de 10 a 16 días posteriores desarrollan los signos (Taylor, 1986). Por lo general no se observan signos francos de NMC hasta que los lechones tienen 6 semanas de edad o más (Ross, 2000)

### 2.3.4.- Factores Ambientales

La neumonía por micoplasma afecta a los cerdos en los meses fríos y cuando se agregan factores predisponentes, tales como: humedad, ventilación,

hacinamiento (Schifferli *et al.*, 1990), grado de microbismo o estado sanitario de la granja, balance nutricional, manejo de los animales, corrientes de aire directa, alta concentración de amoníaco y polvo en el aire (Camacho, 2004).

Los parámetros climáticos evaluados en los diferentes trabajos no tienen un efecto *per se*, sino que son consecuencia del manejo; así la ventilación está asociada con los gases y éstos con la higiene, al igual que la humedad, el polvo y el microbismo. Un aumento en el flujo de aire no controlado provoca una disminución en la temperatura, humedad y gases (mayor en CO<sub>2</sub>) que en amoníaco e indica una elevación de polvillo- endotoxinas y del microbismo (Andrada *et al.*, 2002). Este ambiente seco favorece, a su vez que el polvo se aerolice y quede suspendido en el aire (Donham, 1991).

El amoníaco se produce por descomposición de heces y está más relacionado con la limpieza que con la ventilación. Los gases están relacionados entre sí y con el microbismo. El amoníaco y el H<sub>2</sub>S están relacionados con la limpieza y son indicadores negativos de la ventilación (Donham, 1991). Por otro lado, el CO<sub>2</sub> se produce por la respiración de los cerdos y responde linealmente a la ventilación. Debido a esto, se utiliza este indicador interpretando, que niveles altos de CO<sub>2</sub> indican una deficiente ventilación o un exceso en la densidad de animales, y niveles muy bajos indican una alta ventilación que produce polvo, baja temperatura o pocos animales por superficie, indicando una utilización no óptima de las instalaciones (Andrada *et al.*, 2002).

#### 2.3.5.- Enfermedad

Largos períodos de incubación, la diseminación lenta del microorganismo en las camadas, el aumento de la densidad de animales, la diseminación de otros agentes infecciosos y factores del medio ambiente que se desarrollan después del destete contribuyen al pico de prevalencia de la enfermedad por *M. hyopneumoniae* en cerdos en crecimiento y acabado (Ross,

2000).

Existen dos formas de presentación de la enfermedad, la forma aguda y la crónica (Camacho, 2004). La forma aguda presenta una mortalidad del 5% y una morbilidad de hasta 100%, aunque Hurley (1995) encontró una morbilidad de 7-11% (Ross, 1990a). La forma crónica es la más común y se observa en las piaras infectadas en forma enzótica (Camacho, 2004).

La bibliografía refleja claramente que la NMC se encuentra distribuida a nivel mundial con un 90 a 95% de explotaciones afectadas y de un 70% a 100% de los animales infectados. Los trabajos realizados en varios países indican que las lesiones típicas de la NMC ocurren de 30% a 80% en los cerdos sacrificados (Andrada *et al.*, 2002).

En los Estados Unidos, un estudio de 337 granjas en 13 estados indicó que el 99% de los cerdos presentaban lesiones neumónicas (Andrada *et al.*, 2002); una encuesta reciente en Minnesota reveló que el 100% de 125 piaras tenían lesiones típicas de la “neumonía enzótica” y el 75% de los cerdos estaban afectados. Sin embargo, Tielens, 1995 indicó que la prevalencia de neumonía en el momento del sacrificio en los Países Bajos ha disminuido del 23% en 1981 a 5.8% en 1990 (Ross, 2000).

En México, en la mayoría de las granjas de ciclo completo se han encontrado animales con anticuerpos, indicando que *Mycoplasma hyopneumoniae* es ubicuo (Morilla, 1997). Ibarra (2000) en el Perú, en un estudio realizado en granjas de crianza artesanal encontró que un 11.25% de los animales eran seroreactores positivos al *M. hyopneumoniae* y Huallanca (2001), encontró que el 12.2 % animales resultaron reactores positivos de un estudio realizado en un camal de Lima Metropolitana.

### 2.3.6.- Complejo Respiratorio Porcino (CRP)

Recientes estudios revelan la importancia de *M. hyopneumoniae* en el complejo respiratorio porcino como agente primario y el incremento de la severidad de otros patógenos respiratorios (Thacker *et al.*, 1999a).

Este complejo, esta caracterizado por un crecimiento lento, reducción de la eficiencia alimenticia, letargia, anorexia, fiebre, tos y disnea, especialmente entre las 18 y 20 semanas (Thacker *et al.*, 1999b).

La presencia concomitante de varios agentes en el pulmón es mas frecuente que la aparición de *M. hyopneumoniae* puro (Thacker, 2001). El complejo de la enfermedad Respiratoria Porcina (CERP) incluye al menos el virus del PRRS y a *M. hyopneumoniae* (Andrada *et al.*, 2002); a su vez se ha demostrado su sinergismo (Bosch, 2000).

Conjuntamente con *M. hyopneumoniae* se aíslan frecuentemente otros microorganismos que dan lugar a una infección neumónica secundaria. Así, Gois *et al.*, 1980 encontraron *M. hyorhinis* (64%), *Streptococcus spp.*(41%)(Andrada *et al.*, 2002), *Pasteurella multocida* (35%)(Clark, 1999), *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis*, *Actinomyces pyogenes* (Thacker *et al.*, 1999c), *Actinobacillus pleuropneumoniae*, el virus de Pseudorabia (Desrosiers, 2001) e influenza porcina (SIV). Siendo frecuentemente hallados SIV y el virus PRRS (Thacker *et al.*, 1999b).

La mayoría de casos con el CRP que se han estudiado en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad del Estado de Iowa, fueron positivos al virus del PRRS y presentaban lesiones microscópicas típicas de la infección con *M. hyopneumoniae* (Thacker *et al.*, 1999c).

En una infección mixta se han evaluado la reducción en la ganancia de peso de 16 a 30% y disminución en la conversión alimenticia de 14 a 20% (Thacker *et al.*, 1999c).

## 2.4.- Inmunidad

En el cerdo, al igual que en el resto de mamíferos, la respuesta inmunitaria consiste en el reconocimiento de moléculas ajenas al organismo y en los mecanismos de defensa frente a ellas. Los principales mecanismos por los que las bacterias extracelulares producen enfermedad se basan por un lado en su capacidad de producir endotoxinas o exotoxinas, y por otro lado, en los fenómenos inflamatorios que generan su presencia y multiplicación en las superficies orgánicas (Mateu de Antonio *et al.*, 1997).

El *Mycoplasma* emplea diversos medios para evadir los mecanismos de respuesta del hospedero, ya sea el sistema natural, sistema innato o inmunidad inducida por vacunas (Thacker, 1997).

### 2.4.1.- Inmunidad humoral

Las bacterias extracelulares como *Mycoplasma hyopneumoniae* usualmente estimulan una respuesta inmune humoral como principal mecanismo de respuesta inmune protectora (Thacker, 1997).

Los polisacáridos de la superficie celular estimulan inicialmente a los linfocitos B, dando como resultado un incremento marcado de la IgM, seguido por la producción de IgG y de IgA. Debido a que el micoplasma es un patógeno no invasivo del epitelio respiratorio, induce la producción de IgA respuesta que cumple un rol importante en la defensa contra la infección, colonización y subsiguiente desarrollo de signos clínicos (Thacker, 1997).

El sistema inmune mucosal consiste en la especialización del tejido linfóide asociado con las membranas mucosales, ya sea del tracto respiratorio, urogenital o gastrointestinal; esto hace que se cumpla un rol crítico en el éxito o fracaso de las vacunas. Muchos estudios sugieren que los anticuerpos circulantes parecen estar envueltos en la protección contra la enfermedad, es así que una respuesta mejorada y completa va a requerir la estimulación de la

respuesta inmune local mucosal del tracto respiratorio (Thacker, 1997)

La inmunidad materna inhibe el desarrollo de ambas respuestas local y sistémica, produciendo una demora en el desarrollo de la NMC (Thacker, 2001a).

Los porcinos infectados con el microorganismo desarrollan anticuerpos contra la proteína p97, la cual se asocia a la virulencia de la cepa, presenta variabilidad antigénica que parece ser el mecanismo usado para evadir el sistema inmunitario en los porcinos (Thacker, 1997). Análisis de la secuencia de ADN del gen que codifica la adhesina han revelado la existencia de dos regiones R1 y R2, llevando a formular la teoría de que el micoplasma usa su región R2 como estímulo para el sistema inmune ya que la porción R1 sería la esencial para la adhesión (Andrada *et al.*, 2002).

Estudios posteriores encontraron la presencia de p97 como parte un operón, que también tiene una proteína p102 que se cree funciona como proteína accesoria de la p97 en la adherencia a los cilios (Chang, 2001); a su vez se halló la proteína p110 que inhibiría la adhesión de células intactas de micoplasma a células epiteliales de tejido traqueal (Andrada *et al.*, 2002).

Las proteínas p42, p60 y p70 del *M. hyopneumoniae* se han identificado como parte del grupo de proteínas sintetizadas como medio de defensa del microorganismo frente a estrés y la p36, proteína citoplásmica posee actividad deshidrogenada, se cree que podrían usarse en el diagnóstico (Andrada *et al.*, 2002).

#### 2.4.2.- Inmunidad Celular

La respuesta mediada por células produce linfocitos que destruyen los organismos ya sea directamente o por aumento en la producción de anticuerpos por los linfocitos B (Thacker, 1997).

Estudios revelan que el *M. hyopneumoniae* no confiere una respuesta TH1 que es la que activa macrófagos para la fagocitosis y destrucción del microorganismo, sino que estimula una respuesta TH2 que es probablemente menos efectiva en el control y eliminación del microorganismo (Thacker, 2001a)

Se ha demostrado que el *M. hyopneumoniae* ejerce un papel inmunosupresor, alterando la función de los macrófagos y los neutrófilos, causando una reducción significativa de la fagocitosis (Caruso *et al.*, 1990).

Se encontró en fluido bronquioalveolar afectado por *Mycoplasma spp.*, aumento del factor de la necrosis tumoral (TNF), interleukina 1 (IL-1), interleukina 6 (IL-6), y prostaglandina E2 (PGE2). La supresión de macrófago y neutrófilos ha sido correlacionada significativamente con la concentración de PGE2, que inhibirá la acción de los polimorfonucleares y neutrófilos en las vías aéreas de cerdos infectados, dando origen a una infección bacteriana secundaria (Quezada *et al.*, 1998).

Las células micoplásmicas tienen interacción con células linfoides. Las membranas del microorganismo resultan ser mitógenas para linfocitos de porcinos **in Vitro** (Messier y Ross, 1991), los cerdos infectados con el microorganismo tienen alteraciones de la función macrófago alveolar (Ross, 2000).

Tajima *et al.*(1984), encontraron que las lesiones neumónicas eran menos severas en cerdos que habían sido timentomizados, sugiriendo la importancia del mecanismo de inmunidad mediada por células en el desarrollo de las lesiones neumónicas (Thacker *et al.*, 1999c). Sin embargo, dos estudios de la respuesta de inmunidad mediada por células en cerdos mostraron inconsistencia **in Vitro** en la estimulación de linfocitos por vacunación con antígenos de *M. hyopneumoniae* (Thacker *et al.*, 1998).



## 2.5.- Patogenia

La patogénesis de la NMC es compleja y no sólo depende del daño causado por el microorganismo, sino también el causado por el sistema inmune del hospedero (Thacker, 1999c).

El período de incubación de la NMC fue descrito por Betts (1952) como 10-16 días bajo condiciones naturales; sin embargo otros estudios han indicado una variedad considerable de duración (Ross, 2000).

El tiempo en el que los cerdos se infectan con *M. hyopneumoniae* parece depender del estado infectivo y lo inmune de la piara. Se ha reportado que los cerdos adquieren la infección de las madres durante el período de lactancia, siempre y cuando estas se hayan infectado en la gestación (Armstrong, 1982).

El comienzo de la enfermedad es probable que dependa de la intensidad de la infección con el microorganismo en las superficies de las mucosas traqueal y bronquial. La enfermedad se describió en cerdos de dos semanas de edad, pero por lo general se disemina lentamente y muchos cerdos no evidencian la enfermedad hasta que tienen 3-6 meses de edad (Ross, 2000).

La diseminación se realiza a nivel del tracto respiratorio, fijándose al epitelio respiratorio de la tráquea, bronquios y bronquiolo (Blanchard *et al.*, 1992); mientras en las áreas no ciliadas del pulmón, tales como las vías aéreas terminales y alvéolos, se observa escasa cantidad de microorganismos (Ross, 1991).

El *M. hyopneumoniae* ataca los cilios del epitelio traqueal y bronquial resultando en destrucción y pérdida de los mismos (Thacker *et al.*, 1999c). El mecanismo por el cual el microorganismo se adhiere a los cilios no está definido, sin embargo se sabe que están involucradas organelas no específicas (Janke, 1997).

Colonizaciones fuertes dan como resultado ciliostasis y pérdida de cilios de la superficie epitelial respiratoria (Janke, 1997); es así que en exámenes de tejido pulmonar de porcinos infectados con *M. hyopneumoniae* se evidencia ciliostasis y pérdida de cilios (De Bey *et al.*, 1992).

La adherencia de estos microorganismos es esencial para la colonización porque son eliminados mediante el aclaramiento mucociliar (Zielinski *et al.*, 1992). Se piensa que la pérdida de la función mucociliar es un factor importante en el aumento de infecciones por agentes secundarios asociados a la neumonía micoplasmal (Thacker *et al.*, 1999c).

El mecanismo por el cual se induce la enfermedad y cambios en el sistema inmune es desconocido (Thacker, 2001a); pero se conoce que el micoplasma es capaz de producir peróxido de hidrógeno y otros radicales de oxígeno que pueden afectar la membrana celular del hospedero (Janke, 1997). No se ha demostrado evidencia de unión u orientación especializada del microorganismo a las células epiteliales.

Se piensa que los cambios microscópicos, sobre todo la hiperplasia peribronquial y linforeticular perivascular, reflejan la importante participación de la respuesta inmune en el desarrollo de la lesión (Ross, 2000).

En general los micoplasmas patógenos utilizan un proceso de virulencia muy complejo, éste involucra la unión/ colonización, citotoxicidad, competición por el sustrato y la evasión y modulación de la respuesta inmune del huésped. Estos procesos no se miden por un solo efecto, sino por la expresión de una multitud de productos genéticos (adhesinas, receptores de nutrientes, mitógenos, polímeros de polisacáridos y los intermediarios metabólicos) (Ross, 2000).

La irritación estimulada por la proliferación de los microorganismos en el epitelio del tracto respiratorio resulta en tos que es un eminente signo clínico

de la infección. La parálisis de la clarificación mucociliar para la retención de secreciones inflamatorias y debris celular en las vías aéreas bajas y alvéolos provee una oportunidad para la infección de bacterias secundarias y exacerba los problemas neumónicos demorando la recuperación (Janke, 1997).

*M. hyopneumoniae* induce la producción de citoquinas pro inflamatorias como interleukina 1 $\alpha$  y  $\beta$ , interleukina 6 y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF). Estas citoquinas son producidas por macrófagos y monocitos e inducen la inflamación local; aunque el mecanismo por el cual se inducen estas células es desconocido, el estudio de otros micoplasmas involucra lipoproteínas de superficie (Thacker *et al.*, 2000).

## **2.6.- Signos clínicos**

Los signos clínicos de la NMC son variables según la fase evolutiva de la enfermedad, pero siempre se observan en un grupo de animales y no de forma individual, los signos se exacerban por condiciones de estrés y/o por infecciones secundarias, pudiendo llegar estas complicaciones a originar la muerte de los animales afectados (Andrada, 2001).

El principal signo clínico es una tos crónica, improductiva (Clark, 1999). Sin embargo en infecciones naturales agudas, se observa anorexia, respiración con soplo, hipertermia moderada e inapetencia (Andrada, 2001).

El comienzo de la enfermedad es gradual, empieza pasado el primer mes (a partir de 6 días post infección) y la tos continúa durante unas semanas (presenta un pico a los 27 días post infección) o incluso meses (Andrada, 2001), aunque algunos cerdos afectados presentan poca tos o nada (Clark, 1999). La intensidad en la tos es con frecuencia máxima en cerdos en crecimiento y acabado. Los movimientos respiratorios son normales, a menos que haya compromiso extenso del pulmón, en especial por infección bacteriana secundaria (Ross, 2000).

Según evolucionan en forma crónica, los signos van desapareciendo, primero la hipertermia y en algunos casos la tos (Andrada, 2001). La mayoría de cerdos con NMC no evidencian malestar, pero no crecen y su cubierta de piel no es normal, el crecimiento puede retardarse y puede haber enanismo, aunque el apetito es normal (Ross, 2000).

Otros signos clínicos relacionados con la infección son poco frecuentes, aunque algunos trabajos hacen mención de artritis, cojera y lesiones serofibrinosas relacionadas con la virulencia de la cepa utilizada (Andrada, 2001).

La muerte asociada con infección bacteriana secundaria y estrés puede ocurrir entre los 4 y 6 meses de edad. Los animales con este “brote secundario” pueden evidenciar inapetencia, respiración dificultosa, aumento en la tos, temperaturas elevadas y postración (Ross, 2000).

## **2.7.- Lesiones**

Encuestas realizadas a nivel mundial en muchos países, indicaron que las lesiones típicas de la neumonía micoplasmal ocurren en el 30-80 % de los cerdos a camal (Ross, 2000).

Durante el inicio de la enfermedad, los lóbulos se presentan ligeramente inflamados y brillantes, de color púrpura, con una consistencia firme y más pesada que el tejido normal. En esta fase de la infección los pulmones son órganos ideales para el diagnóstico por que el microorganismo se encuentra en grandes cantidades (Armstrong, 1982).

Las lesiones macroscópicas consisten en áreas de consolidación de color púrpura (agudo) a gris (crónico) (Thacker *et al.*, 1999). Las lesiones se encuentran casi siempre en las porciones ventrales de los lóbulos craneales y medio, el lóbulo accesorio y la porción craneal de los lóbulos caudales de los pulmones (Ross, 2000).

El aspecto de los pulmones afectados semeja a pulmones atelectásicos sobre todo en la fase crónica de la enfermedad. En las fases tempranas y medias de la enfermedad existe un exudado catarral en las vías aéreas. Los ganglios linfáticos bronquiales y mediastínicos están a menudo agrandados (Ross, 2000).

Las lesiones microscópicas en fases tempranas consisten en pequeñas acumulaciones de neutrófilos en la luz y alrededor de las vías aéreas, así como en los alvéolos. Se ven linfocitos y monocitos que infiltran la adventicia de arteriolas y alrededor de las vías aéreas (Thacker, 2001a). A medida que la enfermedad progresa, aumenta el número de linfocitos en los tejidos perivascular, peribronquial y peribronquiolar, así como en la lámina propia de las vías aéreas.

Los alvéolos pueden contener líquido de edema eosinófilo y grandes cantidades de las células mononucleares, septales y polimorfonucleares. Alrededor de los 15-20 días hay formación de manguitos o hiperplasia linfoide alrededor de las vías aéreas, acumulaciones más extensas de líquido inflamatorio de edema, grandes células mononucleares y otras células inflamatorias en alvéolos y engrosamiento de los tabiques interalveolares (Ross, 2000).

## **2.8.- Diagnóstico**

El diagnóstico de Laboratorio no es concluyente en este proceso debido a la presencia del germen en animales completamente sanos. Debido a que el cultivo es muy lento y engorroso y no asequible a la mayoría de los laboratorios, el aislamiento e identificación de *M. hyopneumoniae* no es un método rutinario de diagnóstico (Andrada *et al.*, 2002).

*Mycoplasma hyopneumoniae* es diagnosticado mediante dos tipos de pruebas, la que detectan antígenos y aquellas que detectan anticuerpos.

### 2.8.1.- Pruebas de Laboratorio que detectan Antígenos

#### 2.8.1.1.- Anticuerpos Fluorescentes

Este ensayo se basa en detectar antígenos de *M. hyopneumoniae* en vías aéreas de pulmones infectados. Estos ensayos requieren tejido pulmonar congelado. La practicidad de uso de este ensayo es cuestionable ya que los pulmones deben ser enviados al laboratorio en buen estado para dar resultados óptimos (Thacker, 2001a).

La desventaja de esta prueba es que no puede detectar el antígeno en infecciones de menor grado en porcinos crónicamente infectados y se requiere para el examen contar con un microscopio de fluorescencia (Halbur, 1997).

#### 2.8.1.2.- Inmunohistoquímica

Este ensayo también detecta antígenos de *M. hyopneumoniae*, ha sido desarrollado en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad del Estado de Iowa y puede ser evaluado en fragmentos de tejido en formalina (Thacker, 2001a).

Se usa rutinariamente para el diagnóstico de otros patógenos como el virus del SRRP, Influenza y Coronavirus. Permite observar la presencia de antígeno en las células apropiadas en relación con la típica lesión microscópica. La presencia del antígeno y lesiones consistentes con la enfermedad inducida por el patógeno, permiten el diagnóstico en 24 horas (Halbur, 1997).

Este ensayo es de mucha ayuda en el diagnóstico de neumonía por micoplasma; sin embargo no es específico para *M. hyopneumoniae* ya que se han presentado reacciones cruzadas con otros micoplasmas no patógenos (Thacker, 2001a).

### 2.8.1.3.- Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta técnica está basada en el análisis de secuencia de ADN mediante la utilización de primers (iniciadores) (Andrada *et al.*, 2002). Los primers han sido probados con muchos Micoplasmas y Acholeplasmas descritos en cerdos (*Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma flocculare*, *Mycoplasma hyosynoviae*, *Mycoplasma hyopharyngis*, *Mycoplasma búchale*, *Actinobacillus axantbum*, *Actinobacillus granularum* y *Actinobacillus laidlawii*) así como algunos micoplasmas aviares. Los primers para PCR de *M. hyopneumoniae* no han sido amplificados del DNA de ningún microorganismo (Calsamiglia *et al.*, 1999).

Los primers han sido probados en animales vivos, en estudios usando animales libres de patógenos y desafiándolos con *M. hyopneumoniae*. Después del desafío todos los animales fueron hisopados y mostraron ser negativos por PCR. Sin embargo, PCR es una prometedora herramienta para determinar los perfiles de las piaras, portadores y estado de salud de diferentes granjas con presión de la enfermedad (Calsamiglia *et al.*, 1999).

Numerosos ensayos con PCR han sido desarrollados con el fin de detectar al *M. hyopneumoniae* (Verdin *et al.*, 2000). PCR puede ser extremadamente sensible en la recolección de DNA de pocos organismos, en la mayoría de los casos la mejor muestra proviene de lavados bronquiales. La presencia de *M. hyopneumoniae* en el tracto respiratorio alto y bajo es transitorio. Se ha detectado organismos en hisopado nasal en un 33%, hisopado traqueal en 83% y 100% en lavado bronquio alveolar (Thacker, 2001a).

PCR anidado y “Nested” PCR fueron desarrollados para la detección en explotaciones de cerdos e identificación de cepas de *M. hyopneumoniae*, utilizando como muestras, torundas nasales, fluidos bronquio-alveolares, lavados traqueo -bronquiales y muestras de aire. Las muestras obtenidas de torundas traqueo -bronquiales y de lavados bronquio -alveolares resultaron mejores indicadores de la infección que las muestras obtenidas de las torundas

nasales o tejido pulmonar (Andrada *et al.*, 2002). Sin embargo, estudios previos han detectado que el PCR anidado no detecta *Mycoplasma* de hisopados nasales (Calsamiglia *et al.*, 1999).

El “Nested” PCR resultó ser más sensible en comparación con el PCR anidado, el “Nested” PCR demostró ser valioso para el diagnóstico de infecciones de *M. hyopneumoniae* cuando no se observan lesiones típicas de la neumonía micoplasmal en pulmones o cuando los cultivos resultaron negativos; pero hay que tener en cuenta que también se han observado falsos positivos (Andrada *et al.*, 2002).

#### 2.8.2.- Pruebas Serológicas

La mayoría de laboratorios trabajan con métodos serológicos, ya que estos permiten muestrear gran número de animales (Andrada *et al.*, 2002), detectar exposición de microorganismos en la vida de los animales y poder entender la dinámica de la enfermedad (Calsamiglia *et al.*, 1999).

Los métodos serológicos encontrados de utilidad para el diagnóstico de NMC incluyen la hemoaglutinación indirecta (HAI), Fijación de Complemento (FC) y el Inmuno Ensayo Ligado a Enzimas (ELISA). Otras pruebas incluyen aglutinación, aglutinación de látex e Inmunofluorescencia indirecta (Ross, 2000).

##### 2.8.2.1.- Fijación de Complemento (FC)

La FC es una técnica de alto grado de sensibilidad y especificidad, para grandes volúmenes de muestras al laboratorio, requiere de cierto grado de experiencia, aunque con esta salvedad puede ser una técnica rutinaria asequible (Andrada *et al.*, 2002).

Los anticuerpos frente a *M. hyopneumoniae* se detectan a las dos semanas de la exposición de la bacteria (post infección), pero no se detectan pasados



cinco meses post infección (Andrada *et al.*, 2002).

Presenta varias desventajas, la primera es que detecta IgM, cuya vida en el suero es muy corta (Andrada *et al.*, 2002) y por otro lado presenta reacciones cruzadas con *M. hyorhinis* y *M. flocculare* (Freeman *et al.*, 1984).

#### 2.8.2.2.- Inmuno Ensayo ligado a Enzimas

ELISA es considerado como la prueba de mayor utilidad en serología y puede detectar toda clase de inmunoglobulinas, proporciona medidas cuantificables de los resultados y es considerado muy sensible. Cuando se desarrollo por primera vez, ELISA contenía proteínas antigénicas provenientes del sulfato dodecil sodio solubilizado de células de *M. hyopneumoniae*, las cuales resultaron en reacciones no específicas (Calsamiglia *et al.*, 1999).

Se utilizan dos tipos de ELISA, de bloqueo (detecta anticuerpos por periodos prolongados de tiempo) e indirecto (detecta seroconversión antes) (Halbur, 1997). Esta prueba es la mejor prueba serológica disponible actualmente (Clark, 1999).

##### 2.8.2.2.1.- ELISA indirecto

ELISA indirecto es frecuentemente utilizado en los Estados Unidos. El suero problema es incubado con un antígeno que recubre el fondo de los posillos, así cualquier anticuerpo específico contra *M. hyopneumoniae* se une al antígeno formando un complejo antígeno anticuerpo en la superficie del posillo de la placa.

Después de la incubación y el lavado, se adhiere un conjugado marcado con peroxidasa, el cual se une a los anticuerpos porcinos compuestos con el antígeno del micoplasma. El conjugado no ligado es removido por el lavado y se adhiere al sustrato que contiene un cromógeno, resultando en una reacción de color que puede ser medible. La reacción se expresa como Densidad óptica

(DO), o como el radio de cambio de color de la muestra en comparación con el positivo (Halbur, 1997).

La especificidad del ELISA ha sido mejorado por el uso de un detergente Tween 20 para la extracción de las proteínas de membrana de las células completas de *M. hyopneumoniae*, de ese modo se reduce el contenido de pesos moleculares proteicos altos (mayores de 90kD) y bajos (menores de 31kD) (Calsamiglia *et al.*, 1999).

Bereiter *et al.* (1990) compararon el ELISA indirecto con la prueba de FC en un experimento con cerdos de seis semanas de edad que fueron inoculados y seguidos durante un año. Se detectó anticuerpos dos semanas post infección con FC y a las tres semanas post infección con el ELISA indirecto. Los anticuerpos mediante ELISA pueden ser detectados en niveles bajos por año, pero no son detectables por mas de cinco semanas por FC (Halbur, 1997).

Se ha mostrado que las reacciones cruzadas con *Mycoplasma flocculare* y *M. hyorhinis* son mínimas, especialmente en infecciones naturales, pero todavía existen debido a que tienen las proteínas comunes p74, p53 kDa (Mori *et al.*, 1988) o las proteínas p73 y p41 (Boelske *et al.*, 1987). Aún así, los resultados con ELISA Tween 20 deben ser evaluados con precaución sobre todo cuando las densidades están entre 0.200 y 0.260, debido a que esto es observado en infecciones tempranas o tardías y pueden ser sólo reacciones cruzadas con *M. flocculare* (Calsamiglia *et al.*, 1999).

#### 2.8.2.2.2.- ELISA de Bloqueo

ELISA de bloqueo es más usado en Europa (Halbur, 1997) ya que minimiza los problemas de reacciones cruzadas con otros micoplasmas (Andrada *et al.*, 2002), basado en la utilización de anticuerpos monoclonales antip40 (Le Potier *et al.*, 1994) o antip70 (Feld *et al.*, 1992).

Gracias al uso de anticuerpos monoclonales es posible un aumento en la

especificidad a nivel epitomal, por lo que detecta anticuerpos de infecciones con cepas de campo de *M. hyopneumoniae* y no detecta anticuerpos contra otros micoplasmas no patógenos (Halbur, 1997).

Sorensen *et al.*, en 1992 evaluaron ELISA de bloqueo encontrando una sensibilidad de 93% y una especificidad de 96%.

La detección de anticuerpos es más estable en el tiempo en el ELISA de bloqueo comparado con el ELISA indirecto (Desmettre *et al.*, 1994), pero la seroconversión es detectada antes con el ELISA indirecto, en general existe una interrelación positiva entre las dos pruebas (Halbur, 1997).

Anticuerpos son detectados con ELISA de bloqueo de tres a cuatro semanas post infección y los picos se han observado de diez a doce semanas post infección (Halbur, 1997). Wallgren *et al.* (1996) también comparó el ELISA indirecto con el ELISA de bloqueo y encontró que con el ELISA indirecto los cerdos seroconvertían el día 20 versus el día 40 con el ELISA de bloqueo.

### 2.8.3.- Evaluación de Rastro

Para evaluar la prevalencia de lesiones de MH en la granja, se recomienda revisar los pulmones de los cerdos en el camal, pero se debe tomar en cuenta que, la prevalencia está en relación directa a la incidencia, el tiempo en que apareció la enfermedad y a la tasa de resolución de las lesiones. Si la infección ocurrió temprano, se resuelven las lesiones pulmonares y en el rastro se subestima la prevalencia, sin embargo, hubo pérdida de peso en los animales. Si la infección ocurrió tardíamente en el engorde, en el rastro se observa un gran número de pulmones con lesiones, pero el peso de los animales generalmente no se afecta (Noyes *et al.*, 1988 y Scheidt *et al.*, 1990).

Estudios de Scheidt *et al.* (1990) reportan que por cada 10% de pulmón neumónico se disminuye en 37.3 gramos la ganancia diaria de peso.

## 2.9.- Control y Prevención

### 2.9.1.- Control por Erradicación

Un objetivo de estrategias de control es reducir la severidad del complejo respiratorio porcino sobre todo en las etapas de crecimiento y acabado (Bosch, 2000).

La erradicación de *M. hyopneumoniae* se ha iniciado en varios países, como Dinamarca, Reino Unido y Suiza que tienen unidades de cerdos libres del microorganismo (Andrada *et al.*, 2002).

Existen tres sistemas principales para la eliminación y/o erradicación de la NMC (Baekbo, 1999):

- Eliminar a todos los animales para después repoblar la granja con cerdos no infectados.
- Realización de pruebas y eliminación de todos los animales
- Erradicación sin despoblación y repoblación total, incluyendo cambios temporales en el flujo de producción, lo cual se puede combinar con la administración de antibióticos.

El método 1 se puede utilizar en piaras de finalización; así como en las granjas de ciclo completo, mientras que los métodos 2 y 3 son relevantes sólo en granjas de ciclo completo o en las productoras de lechones para engorde. Un prerrequisito para el método 1, es la disponibilidad de animales procedentes de una fuente no infectada (Baekbo, 1999).

El principal problema de los esquemas de erradicación es que las infecciones por *M. hyopneumoniae* pueden volver a establecerse por sí mismas en granjas libres de neumonía enzótica vía diseminación en aerosol (Andrada *et al.*, 2002)

### 2.9.2.- Control por medidas de Manejo y Bioseguridad

Uno de los mejores métodos para reducir el número de animales con signos clínicos y prevalencia de micoplasma, es evitar el mezclado de diferentes edades, y mantener grupos pequeños de cerdos (20 o menos) con espacio suficiente. Aunque esto no elimina al MH reduce considerablemente la infección y las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Feelstrom, 1992).

Los sistemas tradicionales de producción son; “producción en un solo sitio” o ciclo cerrado y “producción en dos sitios” o ciclo abierto. La introducción del sistema “producción en tres sitios o múltiples fases” aporta una serie de ventajas sobre los métodos tradicionales ya que diferencia a las reproductoras (1 sitio de gestación / partos), recría (1 de destete hasta 25 Kg), Engorde o acabado (1 sitio de 25 Kg. hasta el sacrificio) y se produce la eliminación de agentes infecciosos sin la necesidad de una despoblación total (Andrada *et al.*, 2002).

Las observaciones de Holmgren *et al.* (1994) compararon el número de animales que seroconvertían en un sistema de producción por grupos de “todo dentro todo fuera” y uno continuo, encontraron que los cerdos mantenidos en sistema continuo tuvieron mayor grado de infección a *M. hyopneumoniae* en comparación de los del sistema “todo dentro todo fuera”, debido a que el último redujo considerablemente el grado de contaminación de los cerdos.

El destete precoz aislado y producción en múltiples fases está basado en separar y especializar las fases de la producción, interrumpiendo el ciclo de los patógenos y disminuir la contaminación, obteniéndose animales libres de enfermedad (Andrada *et al.*, 2002).

El establecimiento de tratamientos con antibióticos ha tenido éxitos variables, ya que no previene el establecimiento de la infección, sólo previene la enfermedad clínica y el cese de la medicación lleva a nuevas infecciones. Los

medicamentos más utilizados son tetraciclina, tilosina, lincomicina, tiamulina, espiramicina y quinolonas (enrofloxacin, danofloxacin y norfloxacin) (Andrada *et al.*, 2002).

### 2.9.3.- Vacunación

En el mercado existen diversas vacunas comerciales contra *M. hyopneumoniae*. Todas son inactivadas y la mayoría son de aplicación parenteral y se componen de organismos completos o extractos de ellos, combinados con hidróxido de aluminio. También se ha ensayado el uso de vacunas lapinizadas, aplicadas en aerosol, orales, intraperitoneales y adyuvantadas en diluyente oleoso (Andrada *et al.*, 2002).

Estudios recientes indican que el uso de vacunas comerciales contra *M. hyopneumoniae* confiere protección contra la enfermedad; sin embargo, no eliminan completamente la neumonía o la colonización del micoplasma. Las razones se desconocen, pero se atribuye a que se desconoce exactamente su patogenicidad (Chang, 2001).

La vacunación contra *M. hyopneumoniae* reduce la severidad de lesiones pulmonares hasta en un 50% (Truchan *et al.*, 2000) y limita el número de infecciones secundarias (Maes *et al.*, 2000). Así mismo, mejora la eficiencia alimenticia y la ganancia de peso diario en la fase de acabado (Diekman *et al.*, 1999).

La vacunación induce tanto respuesta celular como humoral (Thacker *et al.*, 1998). Existen adyuvantes acuosos y oleosos en las bacterinas contra *M. hyopneumoniae*, se ha comprobado que los adyuvantes oleosos estimulan altos títulos de respuesta humoral (Millar, 2000).

#### 2.9.3.1.- Vacunación de MARRANAS

La inmunización de las marranas gestantes se ha propuesto como

método para proteger a los animales en la etapa de lactancia. Kobisch *et al.* (1994), inmunizaron marranas a las ocho y tres semanas antes del parto; los lechones fueron desafiados con Mh del tercero al séptimo día de edad; una parte de los lechones nuevamente fueron desafiados a *Pasteurella multocida* (Pm) a los 28 días y terminaron las observaciones a los 42 días de edad. Determinaron los signos clínicos (cuenta diaria de tos por 10 minutos en tres semanas), temperatura rectal, peso, cerdos con neumonía y aislamiento de Mh y Pm. La conclusión fue que la vacunación de las hembras protegió a los lechones contra Mh y en forma indirecta contra Pm, al evitar que se exacerbara la enfermedad.

En 1998, una empresa canadiense que seguía un programa de vacunación de lechones, tuvo un brote de neumonía enzoótica en destete y engorde, es así que decide vacunar a las madres al termino de la gestación teniendo como resultado un control total del brote (Surprenant, 2001).

#### 2.9.3.2.- Vacunación de lechones

En varios experimentos se ha demostrado que los anticuerpos maternos interfieren en la vacunación motivo por el cual debe evaluarse el momento de declive de los anticuerpos calostrales para no interferir con la vacunación (Thacker *et al.*, 2001b).

La vacunación con una dosis es recomendada en hatos relativamente estables con baja incidencia de PRRS y SIV (influenza) en un sistema todo dentro todo fuera.

La vacunación con dos dosis se recomienda cuando existe presión de infección por otros patógenos, y en granjas de Flujo continuo o granjas que no puedan llevar un sistema estricto de Todo dentro Todo fuera (Yeske, 2001).

Lium *et al.* (1994) estudiaron dos vacunas comerciales (Suvaxyn M. hyo de Solvay Animal Health y Stellamune Mycoplasma de Smith kline Beecham Animal Health) dando como resultado, que las dos vacunas redujeron el grado

de lesiones pulmonares y la prevalencia de cerdos con bronconeumonía al rastro, aunque no afectó la ganancia de peso con relación al control.

En 1999 Valdivia *et al.*, encontraron que animales inmunizados contra *M. hyopneumoniae* obtenían mejor rendimiento en peso comparado con animales no vacunados durante el período experimental. Calle, 2003 halló que en lechones provenientes de madres no vacunadas el nivel de anticuerpos descendía con mayor rapidez que en madres vacunadas, así permitió visualizar la necesidad de conferir inmunidad a los animales en la etapa de recría.



### **III.- MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1.- Lugar de Estudio**

El estudio se realizó en una granja porcina tecnificada, ubicada en el valle del río Chillón, provincia de Lima, departamento de Lima; el camal José Olaya y el Laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

#### **3.2.- Sistema de manejo de los porcinos en la granja**

La granja es positiva a *M. hyopneumoniae*, demostrado en estudios anteriores; no se practica la vacunación contra este agente, no se emplea alimento medicado como medida de control y se maneja un sistema de flujo continuo en una producción en un solo sitio.

La granja cuenta con un plantel reproductor de 600 madres, el destete se practica a los  $19 \pm 2$  días, luego pasan al área de recría donde permanecen hasta los 70 días de edad, al término pasan al área de engorde hasta llegar a los 145 días o peso de beneficio (90 Kg. de peso vivo).

El programa sanitario incluye vacunación contra Rinitis atrófica (7 y 21 días de edad), Erisipela porcina (36 días de edad) y Cólera porcino (45 días de edad).

### 3.3.- Animales y Tamaño Muestral

Para determinar el tamaño muestral se utilizó la siguiente fórmula de Diferencias de Medias:

$$n = \left( \frac{(Z(a) + Z(b)) \cdot SD}{m1 - m2} \right)^2$$

donde:

- n = número de animales
- Z(a) = valor tabular al 95% de confianza. (1.96)
- Z(b) = valor para el 90 % la potencia de la prueba. (1.65)
- SD = desviación Estándar esperada. (2)
- m1 = media esperada de la población 1. (84)\*
- m2 = media esperada de la población 2. (81)\*

\*Valdivia y Calle, 1999.

Se calculó como mínimo 12 animales por grupo. Para obtener el tamaño muestral se seleccionaron 12 madres multíparas (segundo – cuarto parto), las cuales fueron vacunadas a los 90 días de preñez.

Los animales fueron identificados con tatuaje en la oreja con un número de cuatro dígitos (1ra letra indicando el grupo, 2do número cero o uno indicando sexo, 3ro y 4to número dentro del grupo). Las prácticas de manejo y el programa sanitario fue el mismo que se emplea en la granja.

Se dividió a los animales en tres grupos, así como se muestra a continuación:

- Control : No vacunados
- Grupo 1 : Animales vacunados los días 35 y 56
- Grupo 2 : Animales vacunados los días 42 y 56

### 3.4.- Materiales usados en el Muestreo

- ❖ Tubos Vacutainer
- ❖ Aguja para Vacutainer (1' x 22 y 1' ½ x 20)
- ❖ Soporte (Holder)
- ❖ Algodón
- ❖ Tintura de Yodo
- ❖ Balanza
- ❖ Fichas diarias
- ❖ Tatuador
- ❖ Tinta china
- ❖ Jeringas
- ❖ Vacunas contra *Mycoplasma hyopneumoniae*

### 3.5.- Materiales y Equipos usados en el Laboratorio

- ❖ Centrífuga
- ❖ Viales
- ❖ Congeladora
- ❖ Pipetas simples y multicanales
- ❖ Tips
- ❖ Kit de ELISA (Herd Check\*M hyo)
- ❖ Agua destilada
- ❖ Erlenmeyer

### 3.6.- Método de Colección de la Muestra

Las muestras de sangre se extrajeron por punción de la vena cava y con tubos al vacío. Las muestras se colectaron en los días 21, 35, 42, 70, 84, 112 y 145.

Las muestras fueron rotuladas con la edad y el número de tatuaje del animal a la que pertenecía y trasladadas al laboratorio de Bacteriología de la Facultad de

Medicina Veterinaria de la UNMSM para la extracción de sueros. Los sueros fueron almacenados en viales a temperatura de congelación hasta su procesamiento mediante la prueba serológica.

Los animales fueron pesados al destete (19 días de edad) y en camal (145 días de edad) para determinar la ganancia de peso vivo.

Para la evaluación de consolidación pulmonar, se examinaron los pulmones en el camal de acuerdo a lo estipulado por Piffer y Britto (1991).

### **3.7.- Método de Detección de Anticuerpos**

#### **3.7.1.- Preparación de las muestras**

Las muestras de suero fueron disueltas en el diluyente del kit en razón de 1:40 antes de empezar el análisis.

#### **3.7.2.- Preparación de la solución de lavado**

Se dejó que la solución de lavado 10X alcanzara una temperatura de 20-27 °C y se mezcló para la disolución de sales precipitadas. La solución de lavado se diluyó en proporción de 1:10 con agua destilada antes de ser empleada.

#### **3.7.3.- Procedimiento del análisis**

Se dejó temperar los reactivos y agitó suavemente con movimientos circulares.

- Se cogió las placas tapizadas con antígenos y se anotó las posiciones de las muestras en el cuaderno de trabajo.
- Se añadió 100 µl de control negativo en los posillos A1 y B1.
- Se añadió 100 µl de control positivo en los posillos C1 y D1.
- Se añadió 100 µl de muestra diluida en los posillos correspondientes.
- Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se aspiró el contenido del líquido de todos los posillos y arrojó en un

recipiente de desperdicios.

- Se lavó cada posillo de tres a cinco veces con unos 350 µl de solución de lavado y aspiró completamente.
- Se añadió 100 µl de conjugado anti- porcino: peroxidasa de rábano a cada posillo.
- Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se aspiró el contenido del líquido de todos los posillos y arrojó en un recipiente de desperdicios.
- Se lavó cada posillo de tres a cinco veces con unos 350 µl de solución de lavado y aspiró completamente.
- Se añadió 100 µl de la solución de sustrato TMB en cada posillo.
- Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se añadió 100 µl de la solución de interrupción en cada posillo.
- Se calibró el lector en blanco con aire.
- Finalmente se midió y anotó los valores de absorbancia a 650 nm.

#### 3.7.4.- Lectura e interpretación de los resultados serológicos

Para que el ensayo sea válido, la diferencia entre el promedio del control positivo y del control negativo debe ser mayor o igual de 0.150. La absorbancia del promedio del control negativo debe ser menor o igual de 0.150. La presencia o ausencia de anticuerpos frente a *M. hyopneumoniae* se determina por medio de una relación entre el valor de absorbancia de la muestra con el promedio del control positivo. El control positivo está normalizado y representa concentraciones significativas de anticuerpos frente a *M. hyopneumoniae* en el suero y plasma porcino. La concentración relativa de anticuerpos en la muestra se determina a través del cálculo del coeficiente de la absorbancia de la muestra con respecto a la del control positivo (M/P). Los títulos finales se calculan a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Log}_{10} \text{ del título} = 1.09 (\log_{10} \text{ M/P}) + 3.36$$

Para determinar la positividad o negatividad de las muestras se consideraron los siguientes criterios: las muestras con coeficientes M/P menores o iguales de 0,3 se consideraron NEGATIVAS y cuando la relación M/P fue mayor o igual de 0,4 se consideraron POSITIVAS.

### 3.8.- Método de evaluación de Consolidación Pulmonar

El método de Piffer y Britto (1991) permite evaluar la prevalencia de neumonía, evaluación del área pulmonar afectada y cálculo de índice de neumonía.

Los pulmones están formados por siete lóbulos, los cuales tienen diferentes porcentajes de participación en relación al peso del pulmón (Tabla 1).

**Tabla 1.- Porcentaje de participación de cada lóbulo en relación del peso total del pulmón de un porcino.**

<b>LÓBULO PULMONAR</b>	<b>% DEL PESO PULMONAR</b>
Apical derecho (AD)	11
Cardiaco derecho (CD)	11
Diafragmático derecho (DD)	34
Apical Izquierdo (AI)	06
Cardiaco izquierdo (CI)	06
Diafragmático izquierdo (DI)	27
Intermedio (I)	05

Siendo así, el evaluador pondrá una puntuación (de acuerdo a la tabla 2) a cada uno de los lóbulos.

**Tabla 2.- Puntuación según la extensión de la lesión de consolidación pulmonar en cada lóbulo de un porcino.**

<b>PUNTUACIÓN</b>	<b>EXTENSIÓN DE LA LESION DE CONSOLIDACIÓN PULMONAR EN CADA LÓBULO (% DE ÁREA PULMONAR)</b>
0	Sin consolidación pulmonar
1	1 al 25
2	26 al 50
3	51 al 75
4	76 al 100

Luego se calcula el área de consolidación por lóbulos según la tabla 3.

**Tabla 3.- Puntuación por Área de consolidación pulmonar por lóbulos de un porcino.**

<b>PUNTUACIÓN</b>	<b>ÁREA DE CONSOLIDACIÓN PULMONAR POR LÓBULO (%)</b>						
	<b>AD</b>	<b>CD</b>	<b>DD</b>	<b>AI</b>	<b>CI</b>	<b>DI</b>	<b>I</b>
0	0	0	0	0	0	0	0
1	1.4	1.4	4.3	0.7	0.7	3.4	0.6
2	4.1	4.1	12.7	2.3	2.3	10.1	1.9
3	6.9	6.9	21.4	3.8	3.8	17.0	3.1
4	9.7	9.7	29.9	5.3	5.3	23.8	4.4

Finalmente, la sumatoria de porcentajes nos da la categoría según la tabla 4.

**Tabla 4. - Puntuación relativa a las categorías de volumen de consolidación pulmonar de un porcino.**

<b>CATEGORIAS</b>	<b>PORCENTAJE DE VOLUMEN DE CONSOLIDACIÓN (%)</b>
0	0
1	0.1 a 11
2	11.1 a 21
3	21.1 a 31
4	31.1 a 41
5	41.1 a 51
6	51.1 a 100

### **3.9.- Análisis Estadístico**

La evaluación de ganancia de peso se realizó mediante la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) por arreglo factorial para observar el comportamiento de las variables por grupo, sexo y la interacción de grupo y sexo; los títulos de anticuerpos fueron analizados mediante Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, no considerándose la variable sexo; el grado de consolidación pulmonar fue evaluado mediante la relación de las variables grupo y ganancia de peso utilizándose la prueba de Kruskall Wallis.

Los datos recopilados para cada esquema de vacunación en lechones provenientes de madres vacunadas son presentados en cuadros estadísticos y figuras de tendencia.



#### IV.- RESULTADOS

En el presente estudio se realizó la inmunización de los animales contra *M. hyopneumoniae* con el fin de observar su influencia en la ganancia de peso y grado de lesión pulmonar. La ganancia de peso, muestra que existe diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre grupos; sin embargo al análisis por sexo y la interacción grupo sexo no mostró diferencia estadística significativa.

Al evaluar los datos de ganancia de peso, se observó diferencia de 6.605 Kg. de peso en promedio entre el control y el grupo 2, sin embargo no se observó la diferencia estadística significativa entre el control y grupo 1, así como, tampoco se observó la diferencia estadística significativa entre el grupo 2 con relación al grupo 1 (Cuadro 1).

La evaluación de ganancia de peso por sexo, no muestra diferencia estadística significativa; sin embargo se observa tendencia a que los machos (85.324 Kg) ganen más peso que las hembras (81.645 Kg) (Cuadro 2). La interacción de los grupos y el sexo con relación a la ganancia de peso, se observó que no existe diferencia estadística significativa, sin embargo, existe una tendencia que los machos del grupo 2 (89.126 Kg) ganen más peso que las hembras del control (77.231Kg) (Cuadro 3).

De los datos de títulos de anticuerpos obtenidos mediante ELISA, se encontró que el grupo 1 obtuvo mayor nivel de títulos de anticuerpos (gráfico 1).

En relación al comportamiento de los títulos de anticuerpos, se puede observar que los tres grupos en el día 21 inician con diferentes títulos de anticuerpos siendo estadísticamente significativo, el grupo 1 muestra títulos más altos ( $3.72 \pm 0.06$ ) con relación al control y al grupo 2. Luego se observa que, esta diferencia estadística significativa se mantiene entre los tres grupos hasta el día 70. En el día 84, en el caso del control y el grupo 1 los títulos de anticuerpos llegan a menor nivel, mientras que en el caso del grupo 2 descienden hasta el día 112 (Grafico 1). Posteriormente se observa, que los títulos ascienden hasta el día 145, llegando a un mayor título en el grupo 1, con relación al control y al grupo 2 (Cuadro 4).

Los animales que tienen menor número de seropositivos en el día 21 fueron los del control; a su vez, se observa que en los grupos 1 y 2 tienen un alto número para este día. Por otro lado, se puede observar que la seroconversión es mayor del 70% en los demás días de muestreo en el grupo 1 y 2, no presentándose así en el control (Cuadro 5).

Mediante la prueba de Kruskal Wallis se observa que el efecto consolidación pulmonar no presenta diferencia estadística significativa, sin embargo se observa la tendencia de menor consolidación en el grupo 2 (Apéndice 8). En el análisis por grados se observa que los animales vacunados presentan mayor número de animales sin consolidación pulmonar o grado cero (Cuadro 6).

**Cuadro 1.- Ganancia de peso promedio e intervalo de confianza de los grupos en el experimento.**

GRUPO	N°	GANANCIA DE PESO PROMEDIO	INTERVALO DE CONFIANZA (95%)	
			Intervalo inferior	Intervalo superior
<b>Control</b>	30	80.808 <sup>a</sup>	77.118	84.498
<b>Grupo 1</b> (Vac. días 35 y 56)	30	82.233 <sup>a, b</sup>	78.543	85.924
<b>Grupo 2</b> (Vac. días 42 y 56)	30	87.413 <sup>b</sup>	83.723	91.103

a,b : letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

**Cuadro 2.- Ganancia de peso promedio e intervalos de confianza por sexos en los animales estudiados en el experimento.**

SEXO	N°	GANANCIA DE PESO PROMEDIO	INTERVALO DE CONFIANZA (95%)	
			Intervalo inferior	Intervalo superior
Hembra	45	81.645 <sup>a</sup>	78.632	84.658
Macho	45	85.324 <sup>a</sup>	82.311	88.337

a,b : letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

**Cuadro 3.-Ganancia de peso promedio e intervalos de confianza resultado de la interacción por grupo y sexo de los animales dentro del experimento.**

GRUPO	SEXO	N°	PESO PROMEDIO	INTERVALO DE CONFIANZA (95%)	
				Intervalo inferior	Intervalo superior
<b>Control</b>	Hembra	15	77.231 <sup>a</sup>	72.012	82.450
	Macho	15	84.385 <sup>a,b</sup>	79.166	89.604
<b>Grupo 1</b> (Vac. días 35 y 56)	Hembra	15	82.005 <sup>a,b</sup>	76.786	87.224
	Macho	15	82.461 <sup>a,b</sup>	77.242	87.680
<b>Grupo 2</b> (Vac. días 42 y 56)	Hembra	15	85.700 <sup>a,b</sup>	80.481	90.919
	Macho	15	89.126 <sup>b</sup>	83.907	94.345

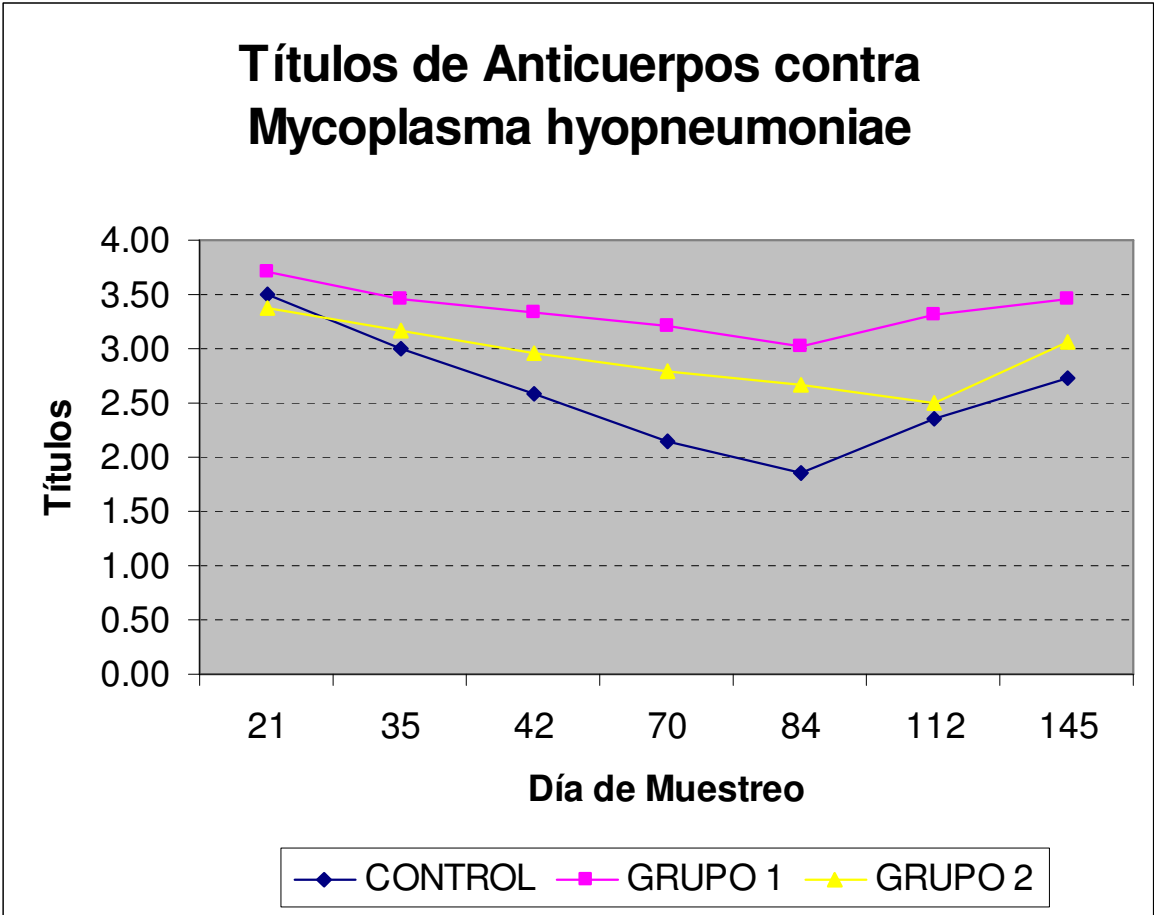
a,b : letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

**Cuadro 4.- Media e Intervalo de confianza de Títulos de anticuerpos con relación a los días de toma de muestras de los tres grupos en el experimento.**

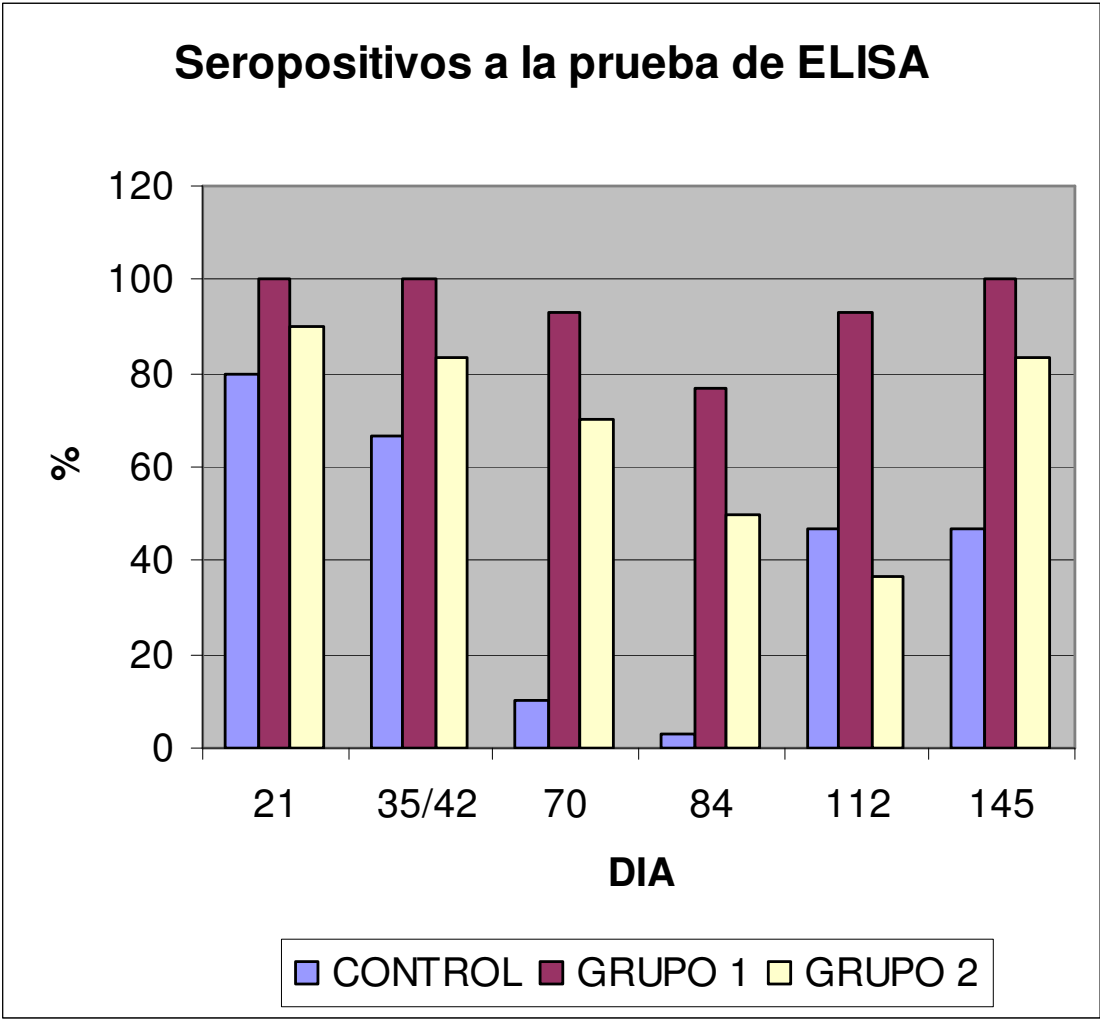
DÍA	N°	MEDIA ± INTERVALO DE CONFIANZA		
		CONTROL	GRUPO 1 (Vac. 35d y 56d)	GRUPO 2 (Vac. 42d y 56d)
<b>21</b>	30	3.50 <sup>b</sup> ± 0.12	3.72 <sup>a</sup> ± 0.06	3.38 <sup>b</sup> ± 0.15
<b>35 / 42</b>	30	3.01 <sup>b</sup> ± 0.98	3.45 <sup>a</sup> ± 0.07	2.96 <sup>b</sup> ± 0.24
<b>70</b>	30	2.15 <sup>c</sup> ± 0.39	3.20 <sup>a</sup> ± 0.08	2.79 <sup>b</sup> ± 0.29
<b>84</b>	30	1.85 <sup>c</sup> ± 0.33	3.02 <sup>a</sup> ± 0.11	2.67 <sup>b</sup> ± 0.21
<b>112</b>	30	2.34 <sup>c</sup> ± 0.43	3.31 <sup>a</sup> ± 0.12	2.50 <sup>b</sup> ± 0.28
<b>145</b>	30	2.73 <sup>c</sup> ± 0.24	3.46 <sup>a</sup> ± 0.08	3.07 <sup>b</sup> ± 0.29

a,b,c: letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

Gráfico 1.- Títulos de Anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, con diferentes programas de inmunización en porcinos provenientes de madres vacunadas.



**Gráfico 2.- Porcentaje de animales seropositivos a la prueba de ELISA según el día de muestreo y grupo respectivo.**



**Cuadro 5.- Número y porcentaje de porcinos seropositivos y seronegativos a *Mycoplasma hyopneumoniae* de acuerdo a los grupos del experimento.**

DIA	CONTROL		GRUPO 1 (Vac. días 35 y 56)		GRUPO 2 (Vac. días 42 y 56)	
	Sero positivos	Sero negativos	Sero positivos	Sero negativos	Sero positivos	Sero negativos
21	24 (80%)	6 (20%)	30 (100%)	0 (0%)	27 (90%)	3 (10%)
35/42	20 (66.7%)	10 (33.3%)	30 (100%)	0 (0%)	25 (83.3%)	5 (16.7%)
70	3 (10%)	27 (90%)	28 (93.3%)	2 (6.7%)	21 (70%)	9 (30%)
84	1 (3.3%)	29 (96.7%)	23 (76.7%)	7 (23.3%)	15 (50%)	15 (50%)
112	14 (46.7%)	16 (53.3%)	28 (93.3%)	2 (6.7%)	11 (36.7%)	19 (63.3%)
145	14 (46.7%)	16 (53.3%)	30 (100%)	0 (0%)	25 (83.3%)	5 (16.7%)

**Cuadro 6.- Grado de lesión pulmonar según grupo de los animales al final del experimento.**

GRADO	N° DE ANIMALES		
	CONTROL	GRUPO 1	GRUPO 2
0	13	20	19
1	14	8	10
2	2	2	1
3	0	0	0
4	1	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
TOTAL	30	30	30

## V.- DISCUSIÓN

El presente estudio, tuvo por objetivo evaluar dos esquemas de inmunización contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en porcinos de una granja tecnificada de flujo continuo, para esto se comparó parámetros productivos, títulos de anticuerpos y grado de consolidación pulmonar.

La ganancia de peso muestra que los animales vacunados (grupo 1 y 2) con relación a los animales del control presentan mayor peso, esto también se observa al final del experimento donde se obtuvo como peso final 94.970 Kg en los animales del grupo 2, frente al control (87.241 Kg) y el grupo 1 (88.390) (Apéndice 2). Los animales que han recibido inmunización presentan mayor peso que los que sólo poseen anticuerpos maternos, lo que demuestra que las crías obtienen mejor peso cuando son vacunadas, tal como lo encontrado por Valdivia y Calle en 1999, donde los animales vacunados presentaron mejor peso que los no vacunados en una crianza de tipo intensiva.

Es de suma importancia no sólo la vacunación sino el momento de vacunación, es así que podemos observar que los animales vacunados en el grupo 2 obtienen mejor ganancia de peso con relación al grupo 1 y al control, obteniéndose una diferencia de pesos que va de 6.58Kg hasta 7.73 Kg. Esto se debe a que la vacunación temprana en animales procedentes de madres con elevada tasa de anticuerpos podría dar lugar a animales desprotegidos en fases tardías y, como consecuencia, a fallos en la eficacia de la vacuna. Es así que, varios autores sugieren cambiar la pauta de vacunación en granjas con elevadas tasas de anticuerpos



maternos retrasando la misma (Quinlan, 1998).

Se ha demostrado que cerdos que provienen de madres de granjas positivas tienen una cantidad de anticuerpos maternos (Thacker, 1997). En el experimento se observa una cantidad elevada de anticuerpos al inicio del experimento (21 días), además del desarrollo de anticuerpos vacunales, siendo posible la existencia de una mayor protección frente al agente y por ende una mejor ganancia de peso al no desarrollar la enfermedad ni presentar las lesiones características.

La ganancia de peso con relación al sexo, no demuestra una diferencia estadística significativa; sin embargo, se puede observar una tendencia a que los machos ganen mejor peso frente a las hembras, observándose una diferencia de 3.68 kg a favor de los machos. La diferencia en aumento de peso a favor de los machos es parte de la genética de los animales ya que existe un dimorfismo sexual; es así que, diversos estudios realizados a través de los años evaluaron que los cerdos machos obtienen mejor peso corporal que las hembras (Blood *et al.*, 1986).

Los títulos de anticuerpos revelan un mejor comportamiento en los esquemas vacunales con respecto al control; si bien es cierto, que todos los grupos el día 21 muestran títulos altos, esto se debería a que la protección calostrada parece ser dependiente de la cantidad de anticuerpos séricos en las cerdas, los lechones procedentes de cerdas con elevados niveles de anticuerpos, permanecerán con títulos considerados protectores hasta aproximadamente las seis semanas de edad (Wallgren, 1998), lo que demuestra la gran actividad del agente dentro del hato y el desarrollo de anticuerpos originados por la inmunización de las madres a los noventa días de gestación. A su vez se observa que, existe una correlación positiva entre los niveles de anticuerpos maternos y los niveles de anticuerpos de sus lechones, lo que concuerda por lo encontrado por Clark (1999).

La diferencia inicial observada entre los grupos con relación a los títulos de

anticuerpos, también puede atribuirse a un mal manejo de los lechones con respecto a la ingesta de calostro.

Se observa en el grafico 2 que el número de animales seropositivos en el control van disminuyendo hasta el día 84, para luego volver a aumentar hasta el día 145. Los anticuerpos maternos decrecen gradualmente en un período de seis semanas (Thacker, 1997); sin embargo, en un estudio realizados por Torres (2003) se encontró que decaen hasta las ocho semanas, contrario a nuestro experimento en donde decaen hasta las diez semanas, debido a que en el experimento provienen de madres vacunadas y la inmunidad responde aparentemente de forma mas efectivamente frente al agente.

En el caso del grupo 1, se observa que los títulos de anticuerpos se mantienen en un nivel alto en comparación a los otros grupos, sin embargo decaen en el día 84 al igual que en el control; se observa una seroconversión al 76.6%. Esto se debería a la variación biológica en el tipo de respuesta inmune que existe entre individuos (Stevenson, 1999).

Se observa que en el caso del grupo 2 la disminución de títulos de anticuerpos llega hasta el día 112, esto se debería a que la aplicación de la primera dosis vacunal fue el día 42 donde los títulos se mantendrían hasta una segunda dosis realizada el día 56, tal como se refleja en el 63.37% de animales seropositivos a la prueba. Los títulos de anticuerpos tienen una duración determinada dependiendo de varios factores como cantidad antigénica de la dosis vacunal, día de inmunización y estado del animal entre otros. Es así que, en estudios realizados en cerdos provenientes de madre no vacunadas se observa que los títulos llegan a declinar entre las 6 a 8 semanas (Calle *et al.*, 2003); sin embargo Wallgren *et al.* (1998) menciona que los títulos de anticuerpos contra *M. hyopneumoniae* pueden decaer en algunos casos a las dos semanas de edad y en otros pueden persistir hasta 6.5 a 9 semanas de edad.

Los grupos presentan un aumento en los niveles de títulos de anticuerpos al final de la producción entre los días 84 y 145 (Gráfico 1), así mismo muestran una seroconversión en el control de 46.7 %, en el grupo 1 del 100 % y en el grupo 2 de 83.3%, esto se debería a la interacción con el agente en la etapa de engorde, tal como lo menciona Janke (1997) donde los cerdos sufren mayor presión de la enfermedad en la etapa de recría y posteriormente en la etapa de crecimiento y acabado; así mismo se observa que la respuesta inmune es mas eficiente y rápida frente al agente en animales que han recibido dosis vacunales en relación al grupo que sólo poseía inmunidad por anticuerpos calostrales.

El porcentaje de animales seroreactores positivos muestra que los tres grupos al final del experimento tienen altos valores (entre 36% y 100%), contrario a lo encontrado por Huallanca (1999) con un 12.2% de seroreactores positivos en 7 granjas tecnificadas de Lima. Esto muestra la gran actividad del agente en el hato y el desarrollo de una mayor inmunidad por causa de la vacunación.

A pesar de presentar mejor nivel de títulos de anticuerpos el grupo 1, no se observa que estos tengan una mejor ganancia de peso, ya que el grupo que obtiene mejor ganancia de peso es el 2. Esto se debería a varios factores, tales como, el mejor nivel de anticuerpos al inicio del experimento, día de inmunización, estado inmunológico del grupo, manejo y aplicación de la vacuna.

El grado de lesión pulmonar refleja que no existe diferencia estadística significativa entre grupos; sin embargo, se observa que los animales del grupo 1 y 2 frente a los del control presentan un menor grado de consolidación pulmonar. Los animales que han desarrollado inmunidad por vacunación reducen significativamente las lesiones en pulmón frente animales que sólo reciben anticuerpos calostrales. Es así, que Keich *et al.* (2001), encontró que cerdos vacunados contra *M. hyopneumoniae* presentaban menor grado de lesión pulmonar

con relación a los cerdos no vacunados y Kuhn (2000) encontró que los animales vacunados reducen de un 80 a 83 % el grado de consolidación pulmonar con relación a los animales no vacunados.

Otro factor por el cual el grado de consolidación pulmonar no presenta diferencia estadística significativa entre los grupos sería, la presencia de múltiples agentes en el tracto respiratorio (Thacker *et al.*, 1999c) y la competición por sustratos en el pulmón, que harían que se modifiquen las lesiones pulmonares características de este agente.

Al evaluar la relación que existe entre la ganancia de peso y el grado de consolidación pulmonar, se observa una correlación indirecta (-0.452) en el grupo 2 ( $p < 0.05$ ), que se traduce en que los animales de este grupo presentan una menor consolidación y una mayor ganancia de peso frente a los otros grupos (Apéndice 9). Sin embargo, no se observa diferencia estadística significativa para el control y el grupo 1. Tal es así que, el mayor grado de consolidación pulmonar afecta directamente la ganancia de peso de los animales, tal como lo expresado por Andrada *et al.* (2002) que encuentra que los cerdos con un 20% de lesión pulmonar durante su vida pueden disminuir su peso hasta en 25 Kg o retrasar su salida al mercado hasta en 25 días.

Se observa que en la ganancia de peso en el estudio, los animales que provienen del grupo 2 tienen mayor ganancia de peso comparados con el control y el grupo 1 (Cuadro 1). Sin embargo, al compararlos con el comportamiento de los títulos de anticuerpos el grupo 1 presenta un nivel más alto de anticuerpos, dando como resultado que un alto nivel de títulos de anticuerpos no necesariamente refleja un mejor peso corporal, ya que tendríamos que haber controlado otros factores que afectan la ganancia de peso. A su vez, se puede observar la tendencia que existe en la disminución del grado de lesión pulmonar por parte del grupo 2 (Cuadro 6).

Finalmente, se resume que los animales que han sido inmunizados por diferentes esquemas tienen un efecto positivo sobre la ganancia de peso, siendo el grupo 2 el que tuvo mejor ganancia de peso.

## **VI.- CONCLUSIÓN**

1. La vacunación ofrece un efecto positivo sobre la ganancia de peso y el mejor esquema de inmunización fue del grupo vacunado los días 42 y 56.
2. Los títulos de anticuerpos varían según el esquema de inmunización utilizado; siendo, el grupo vacunado los días 35 y 56 el que presentó mejor nivel.
3. La vacunación ofrece un efecto positivo en la menor presentación de consolidación pulmonar, sin embargo no se encontró diferencia estadística significativa entre los grupos estudiados.

## VII.- BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Andrada, M. 2001. Estudio etiopatogénico de la Neumonía Enzoótica Porcina (NEP). Tesis Doctoral Facultad de Veterinaria. Universidad de las Palmas de Gran Canaria.
2. Andrada, M.; Fernández, A.; Del Pozo, M. y Sánchez Vizcaíno, JM. 2002. Neumonía Enzótica. En curso virtual de enfermedades de los cerdos. Ed Sánchez Vizcaíno.
3. Armstrong, C. 1982. Neumonía por *Mycoplasma* en el cerdo. Internacional Swine Update. SQUIBB. Jul. 1: 6-8.
4. Artiushin, S. y Minion, F. 1996. Arbitrarily primed PCR analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates demonstrates genetic heterogeneity. Int Syst Bacteriol 46:324-328.
5. Baekbo, P. 1999. Procedures to eliminate M. hyo and produce M. hyo free pigs: an update. Proceeding of American Association of Swine Practitioners annual meeting. St. Louis. 479-481.
6. Bereiter, M.; Young, T.; Joo, H. y Ross, R. 1990. Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. Veterinary Microbiology. 25: 177-192.

7. Betts, A. 1952. Respiratory diseases of pigs. V. Some clinical and epidemiological aspects of virus pneumonia of pigs. Vet Rec 64:283-288.
8. Blanchard, B.; Venna, M.; Cavalier, A.; Le Lannic, J.; Gouranton, J. y Koobisch, M. 1992. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Microbiol 30(4):329-341.
9. Blood, D.; Hemdreson, J.; Radostits, O; Arundel, J. y Gay, C. 1986. Medicina Veterinaria. 5ta Ed. Interamericana S.A. México, DF. 614-618.
10. Bosch, G. 2000. Evaluation of exposure to *Mycoplasma hyopneumoniae*, PRRS virus, and Swine Influenza virus using serology and Polymerase Chain Reaction in growing and finishing swine. Proceeding of American Association of Swine Practitioners. Indianapolis.175-179.
11. Calle, S.; Camacho, C.; Torres, M.; Falcón, N.; Cerón, M. Y Zacarías, E. 2003. Inmunidad natural e inducida contra *Micoplasma hyopneumoniae* medida desde el nacimiento hasta la edad de mercado en cerdos bajo crianza intensiva. Mundo Avícola y Porcino. Feb. 44: 48-49.
12. Calsamiglia, M.; Pijoan, C. y Bosch, G. 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae* in farms using serology and a nested PCR technique. Swine Health Prod. 7(6): 263-268.
13. Camacho, C. y Calle, S. 2003. Neumonía Enzótica Porcina. Mundo Avícola y Porcino. 45:48-51.
14. Camacho, C. 2004. Neumonía a Micoplasma, un tema de actualidad en la porcicultura intensiva. Rev Mundo Vet. Año 2 (5). Abril. 22-24.



15. Carusso, J. y Ross, R. 1990. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections on alveolar macrophage functions in swine. Am J Vet Res. Feb. 51(2): 227-230.
16. Chang, B. 2001. Intraspecies differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* field strains isolated in the United State. 32<sup>nd</sup> annual American Association of Swine Veterinarians. 225-235.
17. Clark, K. 1997. Control or eradication of mycoplasmal pneumonia. Proccedings of the Iowa State University Veterinary Medicine Seminar. 8-10.
18. Clark, K. 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae*: Serology/ Vaccinology. Proccedings of American Association of Swine Practitioners. T. Louis. 365-369.
19. Desmettre, P.; Le Portier, M.; Abiven, P.; Kobisch, M. y Crevat, D. 1994. A blocking ELISA using a monoclonal antibody for the serological detection of *Mycoplasma*. Res Vet Sci. May. 56(3): 45-338.
20. Desrosiers, R. 2001. A review of some aspects of the epidemiology, diagnosis and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. J Swine Health Prod. 9(5): 233-237.
21. Dieckman, M.; Scheidt, A.; Gant, A.; Dant.; Sutton, A.; Truman, M. y Cline, T. 1999. Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on health, growth, and pubertal status of gilts exposed to moderate ammonia concentrations in-all-in-out versus continuos-flow systems. Swine Health Prod. 7(2): 55-61.
22. Donham, K. 1991. Association of environmental air contamination with disease and productivity in swine. Am J Vet Res. 52: 1723-1730.

23. Dudley, S. 1997. Observations of *Mycoplasma* in modern production units. Proceedings of the Iowa State University Veterinary Medicine Seminar. 14-15.
24. Etheridge J.; Cottew, G. y Lloyd, L. 1979a. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from lesions in experimentally infected pigs. Aust Vet J 55:356-359.
25. Farrington D. O. 1976. Immunization of swine against mycoplasmal pneumonia. Proc 4<sup>th</sup> Int Congr Pig Vet Soc, Iowa State Univ, p.4.
26. Feelstrom, C. y Wallgren, P. 1992. The relationship between seroconversion to *Mycoplasma hyopneumoniae* and lung findings to slaughter. IPVS, 12:308.
27. Feld, N.; Qvist, P. y Ahrens, P. 1992. A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. Veterinary Microbiology. 30: 35-46.
28. Freeman, M.; Armstrong, C.; Sands-Freeman, L. y López-Osuma, M. 1984. Serological cross-reactivity of porcine reference antiserato *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. flocculare*, *M. hyorhinis* and *M. hyosynoviae* indicated by the enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation and indirect hemagglutination test. Can J Comp Med. Apr. 48(2): 202-207.
29. Gois, M.; Kurs, F. y Sisak, F. 1980. Microbiological findings in the lungs of slaughter pigs. Proc 6<sup>th</sup> Int Congr Pig Vet Soc Copenhagen. 6:214.
30. Goodwin, R.; Pomeroy, A. y Whittlestone, P. 1965. Production of enzootic pneumonia in pigs with a *Mycoplasma*. Vet Rec 77:1247-1249.

31. Goodwin, R. 1972a. Isolation of *Mycoplasma suis* pneumoniae from the nasal cavities and lungs of pigs affected with enzootic pneumonia or exposed to this infection. Res Vet Sci 13:262-267.
32. Goodwin, R. 1972b. Experiments on the transmissibility of enzootic pneumonia of pigs. Res Vet Sci 13:257-261.
33. Goodwin, M. 1982. Neumonía Enzoótica Porcina. International Swine Update. SQIBB. Jul. 1:1-8.
34. Gulrajani, T. y Beveridge, W. 1951. Studies on respiratory diseases of pigs. IV. Transmission of infectious pneumonia and its different action from swine influenza. J Comp Pathol 61:118-139.
35. Halbur, P. 1997. Making the diagnosis with serology, antigen detection and PCR. Proceedings of the Iowa State University Veterinary Medicine Seminar. 3-7.
36. Holmgren, N.; Gerth-Lofsted, H.; Bergstrom, J. y Wallgren, P. 1994. Prevalences of some respiratory pathogens indifferent piglet breeding systems. IPVS, 13:130.
37. Huallanca, A. 1999. Determinación de reactores positivos a *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos sacrificados en un camal frigorífico. Tesis Bachillerato. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor de San Marcos, Lima.
38. Janke, B. 1997. Pathogenesis of mycoplasmal pneumonia, samples for diagnosis. Proceedings of the Iowa State University Veterinary Medicine Seminar. 1-2.

39. Keich, R.; Sabbadini, L.; Thacker, E.; Thacker, J.; Jolie, R.; Yancey, R. y McGavin, D. 2001. Evaluation of the duration of immunity of Respisure ONE<sup>tm</sup> following experimental challenge with *Mycoplasma hyopneumoniae*. 32<sup>nd</sup> annual American Association of Swine Veterinarians. 91-93.
40. Kobisch, M.; Labbé, A.; Morvan, P. y Cariolet, R. 1994. Evaluation of a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine in pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida*. IPVS, 13:194.
41. Kuhn, M. 2000. Respisure- One: Effective protection against *M. Hyopneumoniae* infection in growing pigs. Pfizer Animal Health Technical Bulletin. Nov. 1-3.
42. Kuhn, M. 2003. Respisure- One: Duración de la inmunidad en cerdos jóvenes cerdos jóvenes con anticuerpos maternos contra *M. Hyopneumoniae*. Pfizer Salud Animal Boletín Técnico. 1-8.
43. Le Portier, M.; Abiven, P.; Kobisch, M. 1994. A blocking ELISA using monoclonal antibody for the serologic detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Reserch in Veterinary Science. 56: 338-345.
44. Lium, B.; Lund, A. y Skomsky, A. 1994. A field study on vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. IPVS, 13:191.
45. Maes, D.; Verdonck, M; Verbeke, W.; Viaene, J. y Kruif, A. 2000. *Mycoplasma hyopneumoniae*: Benefit to lost of Vaccination. Proccedings of American Association of Swine Practitioners. Indianapolis. 327-333.
46. Mare, C., y Switzer, w.1965. New species. *Mycoplasma hyopneumoniae*, a causative agent of virus pig pneumonia. Vet Med 60:841-846.

47. Mateu de Antonio, E.; Martin, M. y Casal, J. 1997. La respuesta inmunológica en el cerdo. Rev. Anapora. 7(63): 5-19.
48. Miller, L. 2000. A field study comparison: Aqueous vs. Oil adjuvanted *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. Proceedings of American Association of Swine Practitioners. Indianapolis. 113-115.
49. Moguel-Molina, J.; De J. Williams, J. y Gutiérrez-Ruíz, E. 1998. Identificación de granjas seropositivas a *Mycoplasma hyopneumoniae* y exploración de potenciales factores de riesgo relacionados a su presentación en 33 granjas porcinas del estado de Yucatán, México. Rev Biomed. 9(3): 167-175.
50. Morilla, A. 1997. Manual para el control de las enfermedades infecciosas de los cerdos. Ed. INIFAP-SAGAR y PAIPEMSAC. México, D.F.: 58-73.
51. Noyes, E.; Pijoán, C. y Fenney, D. 1988. Radiographic study of the evolution of the pneumonic process in slaughter pigs. Proceedings of American Association of Swine Practitioners. 277.
52. Piffer, I. 1983. Pneumonia Enzoótica dos Suínos. Circular Técnico. Embraga. CNIPSA. 5:5-15.
53. Poveda, J.; Ramírez, A.; De la Fe, C.; Assuncao, P. y Díaz-Bertrana, L. 2000. Micoplasmas. En: Manual de Microbiología Veterinaria. 423-430.
54. Pullar, E. 1948. Infectious pneumonia of pigs. I General description, differential diagnosis and epidemiology. Aust Vet J 24:320-330.
55. Quinlan, J. 1998. Delayed vaccination. Pig International;28. 5-29.

56. Ross, R. 1986. Mycoplasmal Disease. In Diseases of Swine by Leman. Iowa State University Press. Iowa, USA. 469-484.
57. Ross, R. 1990a. Mycoplasma Pneumoniae of swine. Proceeding: Mycoplasma Pneumonia Symposia, Iowa State University. Iowa. 1-6.
58. Ross, R. 1991. Pneumonia Micoplásmica Suina. A Hora Veterinaria. 11(61): 9-15.
59. Ross, R. 2000. Enfermedades micoplasmicas. En: Enfermedades del cerdo. 8va Ed, Vol I, Cap 31, Ed. Straw B. Editorial Intermedica, Buenos Aires. 339-350.
60. Rubin, E. y Farber, J. 1990. Patología. Edit. Medica Panamericana. 313-314.
61. Schheidt, A.; Mayrose, V.; Hill, M.; Clark, L.; Cline, T.; Knox, K.; Runnels, L.; Frantz, S. y Einstein, M. 1990. Relationship of growth performance to pneumonia and atrophic rhinitis detected in pigs at slaughter. J.A.V.M.A. 196:881-884.
62. Schifferli, C.; Sonez, C.; Gonzales, H.; Demo, M.; Paz, M.; Finola, M.; Cacciavilani, A. y Mugnaini, M. 1990. Neumonía micoplásmica porcina: patología y aislamiento de micoplasmas del tracto respiratorio del cerdo. Arch Med Vet 22:71-77.
63. Sorensen, V.; Barford, K. y Feld, N. 1992. Evaluation of a monoclonal blocking ELISA and IHA for antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in SPF pig herds. Vet Res. May. 30(2): 488-490.

64. Stevenson, W. 1999. Common mistakes in interpretation of population serology. Proceedings of the American Association of Swine Practitioners. St. Louis. 339-343.
65. Stipkovits, L. 1995. Neumonía por micoplasma en el cerdo. PIGS Misset. Sept. 18-19.
66. Surprenant, C. 2001. *Mycoplasma hyopneumoniae*: Serologic interpretation of herd profiles. 32<sup>nd</sup> annual American Association of Swine Veterinarians. 447.
67. Taylor, D. 1986. Pig Diseases. The Burlington Press, Cambridge, 4<sup>ta</sup> ed, 112-121.
68. Thacker, E. 1997. Mycoplasma vaccines: what we know, what we don't know. Proceedings of the Iowa State University Veterinary Medicine Seminar. 11-13.
69. Thacker, E.; Thacker, B.; Tamara, B. y Jayappa, H. 1998. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. Swine Health and Production. 6(3):107-112.
70. Thacker, E.; Halbur, P.; Ross, R.; Thanawongnuwech, R. y Thacker, B. 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus- induced pneumonia. Journal of Clinical Microbiology. 37 (3): 620-627.
71. Thacker, E.; Halbur, G. y Thacker, B. 1999b. Effect of vaccination on dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and PRRSV. Proceedings of American Association of Swine Practitioners. St. Louis. 375-377.

72. Thacker, E. y Thacker, B. 1999c. *Mycoplasma hyopneumoniae* and PRRS in the finisher. Proceedings of American Association of Swine Practitioners. St. Louis. 483-485.
73. Thacker, E.; Thacker, B.; Kuhn, M.; Hawkins, P. y Waters, W. 2000. Mucosal and systemic characteristics of protective activity of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin. American Journal of Veterinary Research. 61:1384-1389.
74. Thacker, E. 2001a. Mycoplasma diagnosis and immunity. American Association of Swine Veterinarians. 32<sup>nd</sup> annual. 427-269.
75. Thacker, B. y Thacker, E. 2001b. Influence of maternally derived antibodies the efficacy of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin. 32<sup>nd</sup> annual American Association of Swine Veterinarians. 513-516.
76. Torres, M. 2003. Determinación serológica de la infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* en una granja de cerdos de crianza intensiva. Tesis Bachillerato. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. Lima.
77. Trayer, T. 1994. Vaccination reduces Mycoplasmal Pneumonia of Swine in an AIAO herd. Topics in Veterinary Medicine. 5(1).
78. Truchan, L.; Jolie, R.; Runnels, P. y McGavin, D. 2000. Eighteen week duration of Immunity in Pigs vaccinated at 3 or 8 weeks of age with One Dose of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin. Proceedings of American Association of Swine Practitioners. Indianapolis. 125.
79. Trully, J. y Whitcomb, R. 1979. The mycoplasma Vol II. Human and Animal Mycoplasmas. Academic Press. N.Y. 10-24.



80. Valdivia, L. y Calle, S. 1999. Respuesta a la vacunación contra Neumonía enzoótica porcina en términos de producción en la explotación intensiva de cerdos. *Rev Inves Vet del Perú*. Lima. 10: 71-73.
81. Verdin, E.; Kobish, M.; Bove, J.; Garnier, M. y Saillard, C. 2000. Use of an internal control in a nested PCR assay for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection and quantification intratracheobronchiolar washings from pigs. *Molecular and Cellular Probes*. 14(6); 365-372.
82. Wallgren, P.; Schwan, O.; Mattson, S. y Bolske, G. 1996. Comparison of the sensitivity of two ELISA systems for detection of antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in naturally infected pigs. In *Proc of Inter Pig Vet Soc Congress*. 217.
83. Wallgren, P; Bolske, G; Gustafsson, S; Mattsson, S; Fossun, C. 1998. *Mycoplasma hyopneumoniae*; humoral immune responses in sows and offspring following an outbreak of disease. *Proceedings of the 15th IPVS Congress, Birmingham*. Vol 3. 147.
84. Zielinsky, G. y Ross, R. 1992. Morphologic features and hydrophobicity of the cell surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Am J Vet Res*, Jul, 53(7):1119-1124.

## VIII. - APÉNDICE

**Apéndice 1. - Ganancia de peso promedio, valores máximos y mínimos y desviación estándar de los grupos dentro del experimento.**

GRUPO	SEXO	Nº	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DESV. STANDAR
Control	Hembra	15	63.17	87.41	77.2307	7.5045
	Macho	15	70.01	104.84	84.3853	9.6630
Grupo 1	Hembra	15	63.35	100.28	82.0053	14.2661
	Macho	15	64.59	101.22	82.4613	9.1976
Grupo 2	Hembra	15	74.29	97.84	85.7000	6.6335
	Macho	15	63.20	107.46	89.1260	11.7504

**Apéndice 2. – Peso promedio final e intervalos de confianza por grupos en el experimento.**

GRUPO	N° DE ANIMALES	PESO PROMEDIO	INTERVALO DE CONFIANZA (95%)	
			Intervalo inferior	Intervalo superior
Control	30	87.241 <sup>a</sup>	83.532	90.951
Grupo 1	30	88.390 <sup>a, b</sup>	84.680	92.100
Grupo 2	30	94.970 <sup>b</sup>	91.260	98.679

a,b : letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

**Apéndice 3.- Peso promedio final e intervalo de confianza con relación al sexo en el experimento.**

SEXO	N° DE ANIMALES	PESO PROMEDIO	INTERVALO DE CONFIANZA (95%)	
			Intervalo inferior	Intervalo superior
Hembra	45	88.508 <sup>a</sup>	85.479	91.536
Macho	45	91.893 <sup>a</sup>	88.864	94.922

a,b : letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

**Apéndice 4.- Peso promedio final e intervalos de confianza por grupo y sexo en el experimento.**

GRUPO	SEXO	N°	PESO PROMEDIO	INTERVALO DE CONFIANZA (95%)	
				Intervalo inferior	Intervalo superior
Control	Hembra	15	83.831 <sup>a</sup>	78.585	89.077
	Macho	15	90.652 <sup>a,b</sup>	85.406	95.898
Grupo 1	Hembra	15	88.345 <sup>a,b</sup>	83.099	93.591
	Macho	15	88.435 <sup>a,b</sup>	83.189	93.681
Grupo 2	Hembra	15	93.347 <sup>a,b</sup>	88.101	98.593
	Macho	15	96.593 <sup>b</sup>	91.347	101.839

a,b : letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

**Apéndice 5.- Ganancia de peso promedio final, valores máximos y mínimos, desviación estándar de los pesos en el experimento.**

GRUPO	SEXO	N°	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIA	DESV. STANDAR
Control	Hembra	15	70.67	93.81	83.8307	7.3864
	Macho	15	77.41	112.24	90.6520	9.7986
Grupo 1	Hembra	15	69.67	107.20	88.3453	14.8059
	Macho	15	69.59	107.32	88.4347	9.5717
Grupo 2	Hembra	15	82.39	105.04	93.3467	6.3965
	Macho	15	70.20	113.36	96.5927	11.1370

**Apéndice 6. – Títulos de Anticuerpos promedios, valores máximos y mínimos y desviación estándar de los grupos muestreados en diferentes fechas de muestreo.**

<b>DIA</b>	<b>GRUPO</b>	<b>Nº</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DESV. STANDAR</b>	<b>MÍNIMO</b>	<b>MÁXIMO</b>
Día 21	Control	30	3.4993	0.31022	2.57	3.84
	Grupo 1	30	3.7170	0.14840	3.39	3.99
	Grupo 2	30	3.3847	0.40438	2.33	3.88
Día 35/42	Control	30	3.0083	0.60914	0.00	3.70
	Grupo 1	30	3.4483	0.18581	3.11	3.82
	Grupo 2	30	2.9573	0.64101	0.00	3.45
Día 70	Control	30	2.1493	1.04883	0.00	3.38
	Grupo 1	30	3.2007	0.20492	2.59	3.42
	Grupo 2	30	2.7913	0.78993	0.00	3.29
Día 84	Control	30	1.8533	0.90234	0.00	2.90
	Grupo 1	30	3.0243	0.29834	2.21	3.64
	Grupo 2	30	2.6743	0.58657	0.00	3.22
Día 112	Control	30	2.3487	1.15694	0.00	3.60
	Grupo 1	30	3.3127	0.33873	2.21	3.67
	Grupo 2	30	2.5037	0.76504	0.00	3.13
Día 145	Control	30	2.7250	0.63389	0.00	3.40
	Grupo 1	30	3.4610	0.22238	2.85	3.78
	Grupo 2	30	3.0728	0.67686	0.00	3.62

**Apéndice 7.- Grado de lesión pulmonar según grupo y sexo de los animales al final del experimento.**

GRADO	N° DE ANIMALES					
	CONTROL		GRUPO 1		GRUPO 2	
	HEMBRA	MACHO	HEMBRA	MACHO	HEMBRA	MACHO
0	5	8	12	8	9	10
1	9	5	2	6	6	4
2	1	1	1	1	0	1
3	0	0	0	0	0	0
4	0	1	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0

**Apéndice 8.- Análisis Estadístico para grado de consolidación pulmonar según la prueba de Kruskal Wallis.**

**Ranks**

GRUPO		N	Mean Rank
CONSOLID	control	30	48.05
	vacuna día 35 y 56	30	49.52
	vacuna día 42 y 56	30	38.93
	Total	90	

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	CONSOLID
Chi-Square	3.793
df	2
Asymp. Sig.	.150

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: GRUPO

**Apéndice 9.- Análisis Estadístico según la correlación de Sperman para relacionar ganancia de peso y grado de consolidación pulmonar.**

GRUPO	Nº	CORRELACIÓN	SIGNIFICANCIA
Control	30	0.208	0.271
Grupo 1	30	-0.072	0.705
Grupo 2	30	-0.452	0.012*
Total	90	-0.152	0.153

\* Existe diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

**Apéndice 10.- Valor de títulos de anticuerpos por fecha de muestreo y resultados a la prueba de ELISA.**

GRUPO	DIA					
	21		35/42		70	
	TÍTULO	RESULTADO	TÍTULO	RESULTADO	TÍTULO	RESULTADO
CONTROL	3.32	Positivo	2.86	Negativo	2.02	Negativo
	3.39	Positivo	3.06	Positivo	2.27	Negativo
	3.38	Positivo	3.04	Positivo	2.28	Negativo
	3.78	Positivo	3.77	Positivo	3.29	Positivo
	3.78	Positivo	3.71	Positivo	3.15	Positivo
	3.61	Positivo	3.32	Positivo	2.81	Negativo
	3.50	Positivo	3.20	Positivo	2.59	Negativo
	3.63	Positivo	3.43	Positivo	2.74	Negativo
	3.68	Positivo	3.27	Positivo	2.69	Negativo
	3.69	Positivo	3.28	Positivo	2.53	Negativo
	3.62	Positivo	3.44	Positivo	2.72	Negativo
	3.36	Positivo	2.95	Positivo	2.00	Negativo
	3.45	Positivo	3.11	Positivo	2.37	Negativo
	3.64	Positivo	3.40	Positivo	2.73	Negativo
	3.54	Positivo	3.10	Positivo	2.36	Negativo
	3.50	Positivo	3.26	Positivo	2.48	Negativo
	3.64	Positivo	3.08	Positivo	2.55	Negativo
	3.49	Positivo	2.93	Negativo	2.68	Negativo
	2.38	Negativo	1.62	Negativo	0.66	Negativo
	2.30	Negativo	1.59	Negativo	2.39	Negativo
	3.17	Positivo	2.58	Negativo	2.22	Negativo

	1.59	Negativo		Negativo	1.58	Negativo
	3.56	Positivo	3.19	Positivo	2.20	Negativo
	3.67	Positivo	3.29	Positivo	2.47	Negativo
	3.70	Positivo	3.37	Positivo	2.42	Negativo
	2.99	Positivo	2.81	Negativo	2.20	Negativo
	2.87	Negativo	2.34	Negativo	1.64	Negativo
	3.69	Positivo	3.45	Positivo	1.79	Negativo
	2.57	Negativo	2.22	Negativo	2.96	Positivo
	2.89	Negativo	2.49	Negativo	0.00	Negativo
<b>GRUPO 1</b>	3.92	Positivo	3.71	Positivo	3.32	Positivo
	3.82	Positivo	3.60	Positivo	3.26	Positivo
	3.51	Positivo	3.11	Positivo	3.33	Positivo
	3.83	Positivo	3.55	Positivo	3.12	Positivo
	3.69	Positivo	3.42	Positivo	3.30	Positivo
	3.39	Positivo	3.25	Positivo	3.42	Positivo
	3.55	Positivo	3.22	Positivo	3.29	Positivo
	3.75	Positivo	3.50	Positivo	3.11	Positivo
	3.78	Positivo	3.49	Positivo	3.35	Positivo
	3.73	Positivo	3.53	Positivo	3.12	Positivo
	3.99	Positivo	3.82	Positivo	3.36	Positivo
	3.53	Positivo	3.18	Positivo	2.98	Positivo
	3.86	Positivo	3.67	Positivo	3.11	Positivo
	3.83	Positivo	3.51	Positivo	3.27	Positivo
	3.67	Positivo	3.26	Positivo	3.39	Positivo
	3.92	Positivo	3.70	Positivo	3.17	Positivo
	3.58	Positivo	3.20	Positivo	3.39	Positivo
	3.66	Positivo	3.40	Positivo	2.59	Negativo
	3.66	Positivo	3.28	Positivo	3.22	Positivo
	3.57	Positivo	3.78	Positivo	3.28	Positivo
	3.48	Positivo	3.28	Positivo	3.41	Positivo
	3.81	Positivo	3.65	Positivo	3.19	Positivo
	3.76	Positivo	3.48	Positivo	3.01	Positivo
	3.76	Positivo	3.52	Positivo	3.14	Positivo
	3.67	Positivo	3.41	Positivo	2.99	Positivo
	3.79	Positivo	3.45	Positivo	3.37	Positivo
	3.96	Positivo	3.40	Positivo	3.15	Positivo
	3.57	Positivo	3.26	Positivo	3.33	Positivo
	3.74	Positivo	3.41	Positivo	3.41	Positivo
	3.73	Positivo	3.41	Positivo	2.64	Negativo
<b>GRUPO 2</b>	2.45	Negativo	3.29	Positivo	3.11	Positivo
	3.63	Positivo	3.07	Positivo	2.92	Positivo
	2.33	Negativo	3.17	Positivo	3.00	Positivo
	3.20	Positivo	2.87	Negativo	2.51	Negativo
	3.69	Positivo	3.31	Positivo	2.56	Negativo



	3.47	Positivo	3.10	Positivo	2.88	Negativo
	3.53	Positivo	3.16	Positivo	3.26	Positivo
	3.19	Positivo	2.81	Positivo	3.29	Positivo
	3.11	Positivo	2.57	Negativo	3.22	Positivo
	2.39	Negativo	1.90	Negativo	3.16	Positivo
	3.56	Positivo	3.29	Positivo	2.95	Positivo
	3.22	Positivo	2.86	Positivo	3.19	Positivo
	3.52	Positivo	2.92	Positivo	3.16	Positivo
	3.36	Positivo	3.03	Positivo		Negativo
	3.03	Positivo	2.62	Negativo	3.14	Positivo
	3.58	Positivo	3.14	Positivo	3.09	Positivo
	3.55	Positivo	2.94	Positivo	3.28	Positivo
	3.71	Positivo	3.14	Positivo	2.66	Negativo
	3.50	Positivo	3.45	Positivo	3.11	Positivo
	3.70	Positivo	3.31	Positivo	2.77	Negativo
	3.66	Positivo	3.10	Positivo	2.97	Positivo
	3.44	Positivo	3.10	Positivo	3.16	Positivo
	3.71	Positivo	3.34	Positivo	3.21	Positivo
	3.66	Positivo	3.31	Positivo	2.68	Negativo
	3.70	Positivo	3.40	Positivo	2.75	Negativo
	3.55	Positivo	3.23	Positivo	2.94	Positivo
	3.59	Positivo	3.25	Positivo	2.71	Negativo
	2.95	Positivo	2.73	Negativo	3.16	Positivo
	3.88	Positivo				
	3.68	Positivo	3.31	Positivo	2.90	Positivo

GRUPO	DIA					
	84		112		145	
	TÍTULO	RESULTADO	TÍTULO	RESULTADO	TÍTULO	RESULTADO
CONTROL	1.08	Negativo	3.67	Positivo	2.85	Positivo
	1.96	Negativo	3.59	Positivo	3.25	Positivo
	1.89	Negativo	3.63	Positivo	3.25	Positivo
	2.92	Positivo	3.54	Positivo	3.16	Positivo
	2.78	Negativo	3.66	Positivo	3.30	Positivo
	2.41	Negativo	3.54	Positivo	3.46	Positivo
	2.51	Negativo	3.58	Positivo	3.10	Positivo
	2.09	Negativo	3.50	Positivo	2.76	Negativo
	2.25	Negativo	3.06	Positivo	3.39	Positivo
	1.67	Negativo	2.21	Negativo	2.99	Positivo
	2.45	Negativo	3.39	Positivo	2.98	Positivo
	1.73	Negativo	2.91	Negativo	2.64	Negativo
	2.21	Negativo	2.48	Negativo	2.77	Negativo
	2.09	Negativo	3.43	Positivo	2.78	Negativo

	2.33	Negativo	3.17	Positivo	2.68	Negativo
	1.84	Negativo	3.20	Positivo	2.66	Negativo
	2.01	Negativo	0.63	Negativo	2.26	Negativo
	1.44	Negativo	0.00	Negativo	0.54	Negativo
	0.00	Negativo	0.00	Negativo	2.55	Negativo
	0.00	Negativo	0.00	Negativo	1.71	Negativo
	2.47	Negativo	2.17	Negativo	2.80	Positivo
	0.00	Negativo	0.00	Negativo	2.44	Negativo
	1.77	Negativo	0.96	Negativo	3.25	Positivo
	2.43	Negativo	2.20	Negativo	2.46	Negativo
	2.59	Negativo	2.16	Negativo	2.58	Negativo
	1.72	Negativo	2.01	Negativo	2.72	Negativo
	2.01	Negativo	3.41	Positivo	3.10	Positivo
	2.37	Negativo	1.92	Negativo	1.75	Negativo
	0.00	Negativo	1.92	Negativo	2.16	Negativo
	0.00	Negativo	0.00	Negativo	3.03	Positivo
GRUPO 1	3.10	Positivo	3.67	Positivo	3.70	Positivo
	3.09	Positivo	3.60	Positivo	3.72	Positivo
	3.19	Positivo	3.59	Positivo	3.60	Positivo
	2.85	Positivo	3.44	Positivo	3.50	Positivo
	3.15	Positivo	3.63	Positivo	3.64	Positivo
	3.39	Positivo	3.60	Positivo	3.62	Positivo
	3.18	Positivo	3.54	Positivo	3.54	Positivo
	2.79	Negativo	3.44	Positivo	3.50	Positivo
	3.25	Positivo	3.66	Positivo	3.69	Positivo
	3.08	Positivo	3.59	Positivo	3.63	Positivo
	3.25	Positivo	3.54	Positivo	3.55	Positivo
	2.76	Negativo	3.30	Positivo	3.48	Positivo
	3.11	Positivo	3.58	Positivo	3.64	Positivo
	3.22	Positivo	3.11	Positivo	3.69	Positivo
	3.64	Positivo	3.50	Positivo	3.32	Positivo
	2.82	Positivo	3.06	Positivo	2.85	Positivo
	3.19	Positivo	3.38	Positivo	3.37	Positivo
	2.21	Negativo	2.21	Negativo	3.28	Positivo
	2.98	Positivo	3.05	Positivo	3.43	Positivo
	3.11	Positivo	3.39	Positivo	3.67	Positivo
	2.73	Negativo	3.36	Positivo	3.51	Positivo
	2.94	Positivo	2.91	Positivo	3.19	Positivo
	3.12	Positivo	3.35	Positivo	3.29	Positivo
	2.84	Negativo	2.48	Negativo	3.20	Positivo
	2.69	Negativo	3.31	Positivo	3.48	Positivo
	3.02	Positivo	3.43	Positivo	3.37	Positivo
	3.09	Positivo	3.31	Positivo	3.41	Positivo
	3.39	Positivo	3.17	Positivo	3.16	Positivo

	3.24	Positivo	2.98	Positivo	3.78	Positivo
	2.31	Negativo	3.20	Positivo	3.02	Positivo
<b>GRUPO 2</b>	3.03	Positivo	2.98	Positivo	3.29	Positivo
	2.58	Negativo	2.88	Negativo	1.93	Negativo
	2.47	Negativo	2.97	Positivo	3.37	Positivo
	2.20	Negativo	1.88	Negativo	2.95	Positivo
	2.36	Negativo	1.88	Negativo	2.39	Negativo
	2.40	Negativo	2.11	Negativo	3.51	Positivo
	3.14	Positivo	3.13	Positivo	3.26	Positivo
	3.22	Positivo	3.11	Positivo	3.30	Positivo
	3.07	Positivo	2.77	Negativo	2.95	Positivo
	2.93	Positivo	2.94	Positivo	2.94	Positivo
	2.79	Negativo	2.64	Negativo	2.64	Negativo
	2.98	Positivo	2.70	Negativo	3.53	Positivo
	2.81	Positivo	3.05	Positivo	3.41	Positivo
	3.09	Positivo	2.50	Negativo	3.29	Positivo
	3.03	Positivo	2.74	Negativo	3.24	Positivo
	3.05	Positivo	2.95	Positivo	3.22	Positivo
	3.02	Positivo	2.74	Negativo	3.59	Positivo
	2.33	Negativo	2.07	Negativo	3.13	Positivo
	3.00	Positivo	3.00	Positivo	3.24	Positivo
	2.42	Negativo	2.66	Negativo	3.48	Positivo
	2.75	Negativo	2.54	Negativo	3.22	Positivo
	2.78	Negativo	3.00	Positivo	2.98	Positivo
	3.05	Positivo	2.28	Negativo	3.62	Positivo
	2.42	Negativo	2.45	Negativo	3.39	Positivo
	2.36	Negativo	2.77	Negativo	2.81	Negativo
	2.54	Negativo	2.62	Negativo	2.90	Negativo
	2.50	Negativo	3.11	Positivo	3.02	Positivo
	3.03	Positivo	2.64	Negativo	3.06	Positivo
	2.88	Negativo		Negativo	3.31	Positivo